

*EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS  
SOBRE EL FLUJO INTESTINAL DE AMINOÁCIDOS, PRODUCCIÓN DE LECHE Y  
CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS*

**MÓNICA DUQUE QUINTERO**

Orientadores: Martha Olivera Ángel

Ricardo Rosero Noguera

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias –Universidad de Antioquia-, como parte de las exigencias para optar a la obtención del título de doctorado en Ciencias Animales

DOCTORADO EN CIENCIAS ANIMALES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

MEDELLIN, COLOMBIA

2015

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Antioquia por ser un alma mater que me ha permitido crecer no sólo intelectualmente sino personalmente, siempre con el compromiso de trabajar en el mejoramiento del país.

A los coordinadores del programa de Doctorado en Ciencias Animales de la Universidad de Antioquia, la Dra. Martha Olivera, Dra. Nélida Rodríguez, Dr. Henry Cardona y Dra. Marisol Medina por la oportunidad de realizar el doctorado en un programa de excelente calidad y por su ayuda permanente con los trámites administrativos.

A la Dra. Martha Olivera por estos cinco años de orientación. En todo lo que he aprendido en la vida académica he tenido su participación y ayuda. Muchas gracias por enseñarme a hacer ciencia con ética y responsabilidad. Agradezco su disposición, su modo exigente, crítico y creativo de argumentar ideas, siempre investigando y pensando “científicamente” para alcanzar mis objetivos. Gracias especialmente por la confianza que me dio para orientar mi trabajo de doctorado y su apoyo en los momentos más difíciles.

Al Dr. Ricardo Rosero por estos años que duraron mis estudios doctorales. Por su ayuda, apoyo y sobre todo por ser un gran investigador en nutrición animal, que me ha enseñado mucho del conocimiento que he adquirido en esta área. Muchas gracias por su amistad y por la motivación en los momentos críticos de este proceso.

Al profesor Héctor Jairo Correa a quien admiro mucho, por su tiempo y enseñanza en los seminarios, ayuda durante mi proceso de experimentación y por ser un profesor ético, entusiasta e idóneo en la producción de ganado de leche en el país. Gracias por haber aceptado evaluar mi proyecto de doctorado y mi tesis doctoral.

Al Dr. Gagliostro quien acepto ser evaluador de mi proyecto de doctorado, de mi tesis de doctorado y contribuyó de forma muy importante con sus valiosas sugerencias en el mejoramiento de los mismos. También quiero agradecerle especialmente por su forma de hacer sus correcciones y su forma accesible de orientarme siempre.

A la profesora Sandra Posada por sus sugerencias en mi proyecto de investigación de doctorado y haber aceptado ser parte de mi comité tutorial. Por su disposición y apoyo en todo momento.

Al profesor Silvio Ayala, coordinador del laboratorio de Nutrición Animal por su amistad, ayuda y disposición para hacer uso del laboratorio.

A mi querido profesor Ángel Giraldo que en un momento difícil, me permitió hacer las lecturas de cromo en su laboratorio. Gracias por su cariño y apoyo.

Al jefe de Haciendas de la Universidad de Antioquia Dursun Barrios, quien facilitó y permitió la realización de una parte experimental en la Hacienda la Montaña.

A la empresa Solla S.A, el grupo de investigación, nutricionista de ganadería, miembros de la finca Betania y a Javier Henao quienes realizaron sugerencias, me ayudaron en el proceso de formulación y facilitaron todas las condiciones en la finca para la realización de la parte final de este trabajo de investigación.

A los trabajadores de la hacienda la Montaña y la finca Betania.

A mis compañeros del grupo de investigación BIOGÉNESIS y GRICA, con quienes tuve el placer de compartir y con quienes he formado verdaderos lazos de amistad: Albeiro, Tatiana, Myriam, Diana, July.

A los estudiantes de pregrado Jorge Roldan, Natalia Tobón, Leonardo Maldonado y Mateo por su ayuda incondicional en el proceso de aprendizaje y puesta en marcha de la técnica para estimar la digestibilidad intestinal de los alimentos evaluados.

A todos los colaboradores que me ayudaron en este proceso, que fueron muchos, ya que la investigación involucra muchas personas de forma directa e indirecta.

A todos los miembros de la familia Duque Quintero, en especial a mis padres y hermanos por todo su amor, motivación y confianza.

## DEDICATORIA

A mis padres, Jesús Antonio Duque y Marta Lucía Quintero por su amor inconmensurable, sus palabras de aliento, sus abrazos en los momentos difíciles dándome calma y valor para continuar.

A mi hermana Sandra Duque, por su apoyo, esfuerzo, ayuda incondicional y dedicación para que culminara mi doctorado. Por abrirme un espacio en su oficina y estar conmigo madrugadas, noches y fines de semana con el fin de que terminara mi tesis.

A mi hermano Derfrey Antonio Duque, por las orientaciones matemáticas, por su visión del mundo y su ayuda para darme tranquilidad.

Y a mi novio Renzo Sotomayor, por su amor, preocupación, comprensión, alegría, motivación y ayuda permanente durante todo este tiempo.

**.....Gracias por ser los pilares que me ha sostenido en pie en este proceso.**

## TABLA DE CONTENIDOS

|  |    |
|--|----|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....   | 2  |
| <b>TABLA DE CONTENIDO</b> .....  | 6  |
| <b>LISTA DE TABLAS</b> .....   | 9  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....  | 12 |
| <b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....  | 13 |
| RESUMEN.....   | 17 |
| ABSTRACT.....  | 20 |
| <b>CAPÍTULO 1. CONSIDERACIONES GENERALES</b> .....   | 22 |
| <b>1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....  | 22 |
| <b>1.2 OBJETIVOS</b> .....   | 27 |
| 1.2.1 Objetivo General.....  | 27 |
| 1.2.2 Objetivos específicos.....   | 27 |
| <b>1.3 METODOLOGÍA</b> .....   | 28 |
| <b>CAPITULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....  | 31 |
| 2.1 Importancia de la leche de vaca y las principales proteínas lácteas.....   | 31 |
| 2.2 Alimentación de la vaca lechera. Suministro de aminoácidos (AA) al intestino delgado (ID).....   | 36 |
| 2.3 Innovaciones tecnológicas para aumentar el flujo de aminoácidos al intestino delgado: aminoácidos protegidos.....                                      | 44 |
| 2.4 Alimentación de la vaca lechera con una dieta basada en pasto kikuyo y suplemento comercial.Limitantes en la producción de proteína metabolizable...46 |    |
| 2.5 Estudios realizados con aminoácidos protegidos en animales en producción   | 47 |
| Bibliografía.....  | 55 |

**CAPÍTULO 3. DIGESTIÓN DE LA MATERIA SECA, PROTEÍNA CRUDA Y AMINOÁCIDOS DE LA DIETA EN VACAS LECHERAS..... 64**

Introducción..... 66

Materiales y Métodos..... 69

Resultados..... 75

Discusión..... 75

Conclusiones..... 87

Agradecimientos.....87

Bibliografía..... 88

**CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO, FLUJO INTESTINAL DE PROTEÍNA Y PRODUCCIÓN DE LECHE DE VACAS HOLSTEIN.....95**

Introducción.....97

Materiales y métodos.....99

Resultados.....112

Discusión.....116

Conclusiones.....122

Agradecimientos.....122

Referencias.....123

**CAPITULO 5. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INDIRECTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS APORTES DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS METABOLIZABLES EN DIETAS DE VACAS LECHERAS.....130**

Introducción.....132

Materiales y Métodos.....134

Resultados.....143

|                      |     |
|----------------------|-----|
| Discusión.....       | 145 |
| Conclusiones.....    | 149 |
| Agradecimientos..... | 149 |
| Referencias.....     | 149 |

**CAPÍTULO 6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN VACAS LECHERAS. ....155**

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| Introducción.....         | 158 |
| Materiales y métodos..... | 160 |
| Resultados.....           | 167 |
| Discusión.....            | 167 |
| Conclusiones.....         | 172 |
| Agradecimientos .....     | 172 |
| Referencias.....          | 172 |

**CONCLUSIONES GENERALES.....178**



## **LISTA DE TABLAS**

### **Capítulo 2. REVISIÓN DE LITERATURA**

Tabla 1. Composición química de las caseínas

Tabla 2. Estudios realizados para evaluar el efecto de la suplementación de Lys y Met sobre CMS, producción y composición de la leche

Tabla 3. Estudios realizados para evaluar el efecto de la suplementación de Met o Lys y Met sobre CMS, producción y composición de la leche en vacas en pastoreo

### **Capítulo 3. DIGESTIÓN DE LA MATERIA SECA, PROTEÍNA CRUDA Y AMINOÁCIDOS DE LA DIETA EN VACAS LECHERAS**

Tabla 1. Composición nutricional de los alimentos evaluados

Tabla 2. Degradabilidad ruminal, digestibilidad posruminal y total de los diferentes alimentos

Tabla 3. Degradabilidad ruminal y digestión posruminal de la proteína de los alimentos evaluados

Tabla 4. Perfil de aminoácidos (% de la MS) en el alimento (Alim), en el residuo después de 27.4 h de incubación ruminal (RR) y en el residuo después de la incubación abomasal encontrado en las heces (RH) de las diferentes fuentes evaluadas

Tabla 5. Degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de los AA en los alimentos evaluados

#### **Capítulo 4. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS SOBRE EL CONSUMO DE ALIMENTO, FLUJO INTESTINAL DE PROTEÍNA Y PRODUCCIÓN DE LECHE DE VACAS HOLSTEIN**

Tabla 1. Composición química de los ingredientes usados de la dieta en vacas lecheras (% MS)

Tabla 2. Requerimientos de Met y Lys para vacas lactantes

Tabla 3. Composición de la dieta, consumo estimado y balance de AA proyectados

Tabla 4. Composición química de la dieta (forraje y concentrado) y efecto de la suplementación de Met y Lys protegidas sobre la digestibilidad de la MS (DMS), consumo de MS del forraje (CMSf), concentrado (CMSc), metionina protegida (CMet), lisina protegida (CLys) y total (CMSt) de vacas lactantes

Tabla 5. Efecto de la suplementación con AA protegidos sobre la proteína metabolizable (PM) y el balance intestinal de Lys y Met calculados acorde con el Aminocow

Tabla 6. Efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas en la producción y composición de leche en vacas Holstein

#### **Capítulo 5. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INDIRECTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS APORTES DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS METABOLIZABLES EN DIETAS DE VACAS LECHERAS**

Tabla 1. Requerimientos de Met y Lys para vacas lactantes

Tabla 2. Valores observados y predichos para las diferentes variables evaluadas

Tabla 3. Correlación, cuadrado medio del error de predicción y coeficiente de correlación de concordancia para las variables evaluadas

## **Capítulo 6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS SOBRE LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN VACAS LECHERAS**

Tabla 1. Efecto de la suplementación con metionina y lisina protegida sobre la producción de leche, proteína y las diferentes proteínas lácteas en vacas Holstein

## LISTA DE FIGURAS

### **Capítulo 2. REVISIÓN DE LITERATURA**

Figura 1. Contenido de aminoácidos esenciales en el pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) como porcentaje de los AA en la proteína bacteriana en el rumen.

### **Capítulo 6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS EN LA COMPOSICIÓN DE VACAS LECHERAS**

Figura 1. Patrón de electroforesis de la albúmina sérica bovina realizadas en geles de Tricina-SDS-PAGE para obtener la curva estándar. Línea 1. Marcador de peso molecular Bio-rad (Precision Plus protein Dual Color Standars). Línea 2-9. Diluciones seriadas de la albúmina sérica bovina (pureza de 97%) con peso molecular de 66 kDa.

Figura 2. Patrones de electroforesis de las caseínas bovinas y alpha-lactoalbúmina obtenidos desde geles de trichina-SDS-PAGE. Line 1. Marcador de peso molecular Bio-rad (Precision Plus protein Dual Color Standars). Línea 2-10 Muestra de leche bovina.

## LISTA DE ABREVIACIONES

4%LCG: Leche corregida al 4% de grasa  
4EBP1: Factor de iniciación eucariótico 4E unido a la proteína 1  
AA: Aminoácidos  
AACR: Aminoácidos de cadena ramificada  
AADR: Aminoácido degradable en rumen  
AADT: Aminoácidos digeribles en el tracto gastrointestinal  
AAE: Aminoácidos esenciales  
AAEnd: Aminoácidos endógenos  
AAI: Aminoácido inicial  
AAInd: Aminoácido indigestible  
AANDR: Aminoácidos no degradables en rumen  
AANE: Aminoácidos no esenciales  
AAP: Aminoácidos protegidos  
AC: Programa aminocow  
AlphaS1CN: Alpha S1 caseína  
AlphaS2CN: Alpha S2 caseína  
AGNE: Ácidos grasos no esterificados  
AGV: Ácidos grasos volátiles  
AMPK: Proteína quinasa activada por AMP  
AP: Absorción diaria de purina  
Arg: Arginina  
Asp: Ácido Aspártico  
ATCR: Aminotransaminasa 1 de cadena ramificada  
BetaCN: Beta caseína  
BMN: Bolsas móviles de nylon  
BHB: Betahidroxibutirato  
BLYS: Balance de lisina  
BMET: Balance de metionina  
C: Concentración de creatinina en las muestras de orina (mmol/L)  
CC: Condición corporal

CCC: Coeficiente de correlación de concordancia  
CLys: Consumo de lisina  
CMet: Consumo de metionina  
CMS: Consumo de materia seca  
CMSc: Consumo de materia seca del concentrado  
CMSf: Consumo de materia seca del forraje  
CMSLys: Consumo de materia seca de la fuente de lisina protegida  
CMSMet: Consumo de materia seca de la fuente de metionina protegida  
CMSSt: Consumo de material seca total  
Cr: Cromo  
CSN1S1: Gene de la Alpha S1  
CSN1S2: Gene de la Alpha S2  
CSN2: Gen de la Beta caseína  
CSN3: Gen de la Kappa caseína  
Cys: Cisteína  
DI: Degradabilidad intestinal  
DMS: Digestibilidad de la materia seca  
DP: Concentración de los derivados de purina en la muestra de orina (mmol/L)  
DP: Derivados de purina  
DPE: Excreción diaria de derivados de purina  
DR: Degradabilidad ruminal  
DT: Digestibilidad total  
eEF2: factor de elongación eucariótico 2  
EE: Extracto etéreo  
EIF4EBP1: Factor de iniciación eucariótico de la traducción proteína 1 unida a 4E  
ELF5: Factor de transcripción 5 como E74  
ENL: Energía neta de lactancia  
FDA: Fibra en detergente ácido  
FDAi: Fibra en detergente ácido indigestible  
FDN: Fibra en detergente neutro  
Gly: Glicina  
GM: Glándula mamaria

His: Histidina  
HPLC: Cromatografía líquida de alta eficiencia  
ID: Intestino delgado  
Ile: Isoleucina  
JAK2: Janus kinasa 2  
KappaCN: Kappa caseina  
Kct: Coeficiente de excreción diario de creatinina  
Kp: Tasa de pasaje ruminal  
ID: Intestino delgado  
KDCR: Complejo enzimático ceto acil deshidrogenasa de cadena ramificada mitocondrial  
LA: Alpha Lactoalbumina  
LALBA: Gen de la alpha lactoalbumin  
LDA: Lignina en detergente ácido  
LysP: Lisina protegida  
Leu: Leucina  
LDA: Lignina en detergente ácido  
Lys: Lisina  
LYSB: Balance de lisina  
LysP: Lisina protegida ruminalmente  
LYSReq: Requerimientos de lisina  
Met: Metionina  
METB: Balance de metionina  
MetP: Metionina protegida ruminalmente  
METReq: Requerimientos de metionina  
MOD: Materia orgánica digestible  
MS: Materia seca  
MSPE: Cuadrado medio del error de predicción  
MTOR: Diana de la rapamicina en células de mamífero  
MUN: Nitrogeno úreico en leche  
NNP: Nitrógeno no proteico

mTOR: Gen diana de rapamicina en células de mamífero  
N: Nitrógeno  
NOS: Óxido nítrico sintetasa  
PC: Proteína cruda  
PCDR: Proteína cruda degradable en rumen  
PCNDR: Proteína cruda no degradable en rumen  
PDR: Proteína degradable en rumen  
PE: Proteína endógena  
PF: Producción fecal  
Phe: Fenilalanina  
pI: Punto isoeléctrico  
PNDR: Proteína no degradable en rumen  
PNDRDI: Proteína no degradable en rumen digestible intestinalmente  
PKB/Akt: Proteína quinasa B y sensor de energía celular  
PM: Proteína metabolizable  
PMicrob: Proteína microbiana  
PV: Peso vivo (Kg)  
PV<sup>0.75</sup>: Kg de PV metabólico  
RH: Residuo en heces  
rps6: Proteína ribosomal S6  
RR: Residuo ruminal  
SNG: Sólidos no grasos  
ST: Sólidos totales  
STAT5: Transductor de señales y activador transcripcional 5.  
TGI: Tracto gastrointestinal  
Thr: Treonina  
TMRR: Tiempo medio de retención en el rumen  
TND: Total de nutrientes digestibles  
Trp: Triptófano  
Tyr: Tirosina  
Val: Valina



## RESUMEN

El objetivo de este trabajo de investigación fue determinar la tasa de pasaje ruminal de la fracción sólida (Kp), la degradabilidad ruminal (DR) y la digestibilidad intestinal (DI) de la MS, PC y AA del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), de un suplemento comercial y de metionina (MetP) y lisina (LisP) protegidas, así como evaluar el efecto de la suplementación con metionina y lisina protegidas a vacas lecheras en pastoreo sobre el consumo de materia seca, flujo de aminoácidos al intestino delgado, producción, composición y cantidad de proteínas en la leche. Finalmente, se determinó la reproducibilidad y/o concordancia entre las estimaciones iniciales realizadas (valores predichos) y los valores obtenidos en el experimento en campo (valores observados) para determinar los balances de lisina y metionina. El primer experimento consistió en la utilización de dos vacas secas canuladas consumiendo pasto kikuyo y 2 Kg de alimento concentrado, para realizar la determinación de la Kp, utilizando como marcador la FDN mordantada con cromo, la degradabilidad ruminal (DR) se realizó *in situ* y la digestibilidad intestinal (DI) mediante sonda abomasal. El segundo experimento, fue realizado utilizando 12 vacas Holstein multíparas con un promedio de producción de  $24 \pm 4.76$  kg/día entre 2 y 4 partos, con  $126 \pm 14$  días en lactancia. Los animales fueron introducidos aleatoriamente a uno de los dos tratamientos experimentales, los cuales fueron: Control: Animales consumiendo pasto kikuyo y concentrado, sin suplementación con aminoácidos protegidos, MetLys: Animales consumiendo pasto kikuyo y concentrado más suplementación de metionina y lisina protegidas (75 gr MetP y 190 grLysP en promedio respectivamente). El período experimental fue de 20 días, en el cual los primeros 17 días fueron de adaptación a la dieta y los siguientes 3 fueron para recolección de datos y toma de muestras. Los datos para calcular la Kp fueron analizados por regresión no lineal usando el procedimiento NLIN de SAS y mediante estadística descriptiva para la desaparición de la MS, PC y AA. Para analizar estadísticamente las variables de respuesta CMS, proteína metabolizable (PM) que incluyó la PNDR, PMicrob y PE digestibles, requerimiento de Met (METReq), requerimiento de Lys (LYSReq), suministro de Met (Aporte de

Met), suministro de Lys (Aporte de Lys), balance de Met (BMET), balance de Lys (BLYS), relación Met:Lys y producción, composición de la leche y proteínas lácteas, fue utilizado un modelo mixto considerando el animal como efecto aleatorio y los tratamientos como efecto fijo mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS (2001). La producción de leche al inicio del experimento, los días en lactancia y la CC fueron introducidas en el modelo como covariables. Los resultados de la Kp y el tiempo medio de retención ruminal fueron de 3.65%/hora y 27.4 horas, respectivamente. Las mayores DR de la MS y PC fueron para el kikuyo (69.0 y 61.8%) y concentrado (84.7 y 77.2), seguido de la MetP (60.2 y 66.7%) y LysP (6.72 y 11.4%). De forma similar, los mayores promedios en el porcentaje de AADR fueron para el kikuyo y el concentrado, variando entre 58.7 y 68% para el forraje, y 76.1 y 82.9% para el concentrado. Por otra parte, se encontró que la DR de LysP fue de 11.5% mientras que para MetP fue del 65.8% (% del AAI). Las DI de todos los AA como porcentaje del AANDR variaron entre 42.3 y 77.4% para el kikuyo y 42.2 y 59.3% para el concentrado, mientras que los valores para los aminoácidos protegidos fueron de 42.1 para LysP y 58.6 para MetP. En el segundo experimento, los consumo de materia seca del forraje fueron similares entre el grupo control (11.5) y MetLys (11.9 Kg CMS/vaca/día) ( $p>0.05$ ). La producción estimada de proteína metabolizable fue mayor en MetLys que en el grupo control ( $p<0.05$ ), debido a la más alta producción de proteína microbiana en el tratamiento suplementado ( $p<0.05$ ). Los aportes y balances de metionina y lisina que llegan al intestino delgado fueron diferentes entre grupos, siendo mejor en MetLys porque el suministro de aminoácidos protegidos y la producción de proteína microbiana fueron significativamente más altos ( $p<0.05$ ) en este grupo experimental. No se encontraron diferencias significativas en producción de grasa, sólidos no grasos y sólidos totales entre los grupos experimentales ( $p>0.05$ ). Sin embargo se encontró una tendencia a incrementar el porcentaje de lactosa ( $p=0.08$ ) y proteína en la leche ( $p=0.10$ ) cuando los animales fueron suplementados con aminoácidos. Aunque la producción de proteína de la leche no difirió entre tratamientos ( $p<0.05$ ), la producción de  $\alpha$  S1 y  $\beta$  caseína fueron incrementadas en el grupo MetLys ( $p<0.05$ ) mientras que la k-caseína no. Las

concentraciones de metabolitos como BHB y MUN no fueron modificados con la suplementación. Para concluir, en el análisis del grado de ajuste entre los valores de predicción y los valores observados (estimados en campo) se encontró diferencias importantes, debido a que es necesario contar con información confiable para ser introducida en el modelo como son la determinación del consumo de materia seca del forraje y la producción de proteína microbiana.

## ABSTRACT

The objective of this study was to determine the rate of ruminal passage of solid fraction (Kp), the ruminal degradability (DR) and intestinal digestibility (ID) of dry matter (DM), protein crude (PC) and amino acids (AA) of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*), a commercial supplement and rumen protected methionine (MetP) and lysine (Lys) and evaluate the effect of supplemental lysine (Lys) and methionine (Met) added in the form of rumen-protected (RP) to a diet of dairy cows grazing on dry matter intake (DMI), amino acids flow to small intestine, yield and composition of milk and concentration of milk protein. Finally, reproducibility and/or concordance between the initial estimates (predicted values) and data obtained in the experiment when the cow were supplemented (observed values) to determinate the Met and Lys balances were determinate. The first experiment involved two dry cows cannulated fed with kikuyu grass and 2 Kg of concentrate for determinate Kp, using as a marker the chromium mordanted neutral detergent fiber, ruminal degradability (RD) was performed *in situ* and intestinal digestibility (ID) by abomasal incubation tube. The second experiment was carried out on twelve high-yielding lactating Holstein cows with average milk production of  $24.0 \pm 4.76$  kg/day, between 2 and 4 lactations, and  $126 \pm 14$  days in milk. Dairy cows were randomly introduced to one of two treatments. The two treatments were as follows: Control: Cows feed with kikuyu grass and concentrate without AA supplementation, MetLys: control plus supplement of rumen protected methionine and lysine (75 and 190 g/cow/day of MetP and LysP) . The experiment consisted of 20 days divided in 17-day preliminary adaptation period and 3-day experimental period for data collection and sampling. The data to calculate Kp were analyzed by nonlinear regression using the SAS procedure and descriptive statistics for disappearance of DM, PC and AA. For analyse the response variables as DMI, metabolizable protein (MP) which included the rumen undegradable protein (RUP), microbial protein (PMicrob) and endogenous protein (PE), digestible Met and Lys requirement (METReq and LYSReq), supply Met and Ly, balance of Met and Lys (BMET and BLYS), milk production and composition and milk proteins, was used a mixed model considering the animal as a random effect and treatments as fixed

effect by PROC MIXED of SAS (2001). The milk production at the starting experiment, days in milk and score corporal condition were introduced in the model as covariates. The results of Kp and the average rumen retention time were 3.65 h<sup>-1</sup> and 27.4 hours, respectively. The RD of DM and PC were for kikuyu (69.0 and 61.8%) and concentrate (84.7 and 77.2%), MetP (60.2 and 66.7%) and LysP (6.72 and 11.4%). Similarly, higher percentage averages of ruminal degradable aminoacids (RDAA) were for Kikuyu and concentrate, varying between 58.7 and 68% and 76.1 and 82.9% for kikuyu and concentrate respectively. Moreover, the RD for LysP was 11.5% while that MetP had 65.8% (as % AAI). The ID of all AA (as % RUAA) varied from 42.3 and 77.4% for kikuyu and 42.2 and 59.3 % for concentrate while that for aminoacids protected (AAP) were 42.1 for LysP and 58.6 for MeP. In the second experiment, the forage dry matter intake was similar between control group (11.5) and MetLys (11.9 Kg DMI/cow/day) (p>0.05). The metabolizable protein was higher in MetLys in comparison with control (P < 0.05) due to that microbial protein production higher than in control (P > 0.05). The methionine and lysine supply and balance that arrived to small intestine were significantly different between both groups, being it better in MetLys because was supplied protected amino acids and the microbial protein was higher in MetLys than control (p<0.05). No significant differences were found in milk fat, non-fat solids and total solids production between groups (p>0.05). However a tendency to increase the percentage of lactose (p=0.08) and milk protein (p=0.10) when animals were supplemented with AA was found. . Although the milk protein was not affected by the treatment, the yield of  $\alpha$ 1 and  $\beta$ -casein differed (P < 0.05) while the yield of  $\kappa$ -casein was not affected by the treatment. Concentrations of milk metabolites betahydroxybutyrate (BHB) and milk urea nitrogen (MUN) were not changed. Finally, the degree of fit between predicted and observed values had significant differences because is necessary to have reliable information to be introduced into the software such as the forage dry matter intake and microbial protein.

## **CAPÍTULO 1. CONSIDERACIONES GENERALES**

### **1.1 INTRODUCCIÓN GENERAL**

El Consejo Nacional de Política Económica y Social (CONPES) en sus políticas para mejorar la competitividad del sector lechero colombiano plantea que se debe incrementar el nivel de proteína en leche. Dicho nivel se encuentra actualmente en 3,07% y debería alcanzar el 3.4% en los próximos 10 años (Conpes, 2010).

La concentración de proteína en la leche depende de la cantidad, el balance y la absorción de aminoácidos que llega al intestino delgado. En el rumiante, la proteína disponible para absorción reconoce a fuentes como la proteína microbiana (P<sub>Microb</sub>), la endógena (PE) y la proteína dietaria no degradable en rumen (PNDR) (NRC, 2001). Una vía para modificar el contenido de proteína en la leche es la selección genética, ya que la heredabilidad del tenor proteico es de 0,45 (Welper y Freeman, 1992). También se reconoce a la calidad de la dieta como otro de los factores que influye en el nivel de proteína en la leche, ya que las modificaciones logradas en el porcentaje de proteína láctea mediante cambios en la alimentación generalmente están entre 0,1 y 0,3 unidades porcentuales (Manterola, 2002, Palmquist et al., 1993). Esto se debe a que el proceso de síntesis proteica en la glándula mamaria está muy relacionado con el código genético y con un adecuado balance en la absorción de aminoácidos. En efecto, la deficiencia en un aminoácido específico, puede ralentizar dicha síntesis. Los dos aminoácidos más limitantes para la síntesis proteica mamaria son la lisina y la metionina, seguidos por ramificados como leucina, valina e isoleucina en dietas basadas en productos de maíz y soya. En forrajes como Kikuyo, se ha evidenciado que lisina, metionina e histamina serían los tres aminoácidos más limitantes para la producción proteica (Dennison y Phillips, 1983) y en la proteína microbiana, autores como Storm y Ørskov (1984) determinaron que ésta era limitante en metionina, lisina e histidina y al menos uno de los aminoácidos de cadena ramificada (Greenwood y Titgemeyer, 2000). Los requerimientos en

aminoácidos capaces de sostener una alta producción de leche y proteína en animales de alto potencial exceden al aporte de aminoácidos que provienen de la proteína microbiana en dietas basadas principalmente en productos de maíz y soya, siendo necesario el aporte de aminoácidos proporcionados por la proteína no degradable en rumen (Schingoethe, 1996, Schwab, 1996).

Las raciones actualmente utilizadas en los sistemas de lechería especializada resulta inadecuada a fines de incrementar la cantidad de proteína microbiana producida lo que se explicaría en parte por la baja concentración de carbohidratos no estructurales (CNE) y la alta concentración de la PDR del pasto Kikuyo, lo que representa una relación CNE: PDR muy baja, que incluso a pesar de ser mejorada con el alimento concentrado (Rueda et al., 2006), no alcanza el valor mínimo recomendado por el NRC (2001) para vacas lactantes, el cual debería ser entre 30- 40% de la MS (Afzalzadeh et al., 2010). Esto, traería como consecuencia que la cantidad de proteína metabolizable pueda ser limitada para vacas en producción.

La utilización de aminoácidos protegidos (AAP) es una opción interesante para aumentar el flujo total de aminoácidos (AA) que pueden ser limitantes como la lisina y metionina en la proteína metabolizable (PM) cuando los animales son alimentados con alta cantidad de maíz, productos de maíz, torta de soya y alto contenido de forrajes (Berthiaume et al., 2001). Se ha planteado, que la eficiencia en el uso de la PM para la síntesis de proteína en la glándula mamaria está determinada por la cantidad de aminoácidos esenciales (AAE) en la PM y si éste perfil coincide con el requerido por el animal (NRC 2001). La determinación de los AAE que limitan la síntesis de proteínas lácteas permitirán en el futuro alimentar las vacas lecheras con dietas más bajas en PC y suplementadas con AAE limitantes, lo cuál mejorará la utilización de los aminoácidos por el animal, podría evitar el incremento del nitrógeno uréico en sangre y sus potenciales efectos embriotóxicos, disminuir la eliminación de nitrógeno vía urinaria y mejorar la cantidad de energía disponible en el animal para fines productivos (Broderick, 2003, Roseler et al., 1993). Este mejor uso de la proteína, es explicado porque

cuando un AA es limitante y es requerido para la síntesis de proteína, el resto de AAE excederá la cantidad necesitada y por lo tanto su concentración en sangre y plasma se incrementarán, así como su tasa de oxidación en hígado, riñones, tejido muscular y glándula mamaria. Consecuentemente, esta tasa de oxidación disminuye cuando el AA limitante es adicionado a la dieta y el requerimiento es encontrado.

En raciones para vacas lecheras a base de alimentos como maíz y torta de soya, suplementar con AA como la lisina y la metionina sería una estrategia promisoría para aumentar la síntesis y secreción de proteína láctea debido a la baja disponibilidad de estos AA en los anteriores alimentos, lo cual resultaría una limitante para la producción de proteínas lácteas (Nichols et al., 1998, Robinson et al., 1995, Rogers et al., 1989). De igual forma, es posible que en sistemas a base de pasturas y con suplementación energética basados en torta de soya y maíz se presenten estas mismas deficiencias para estos dos aminoácidos.

Para tal fin es necesario desde la nutrición plantear propuestas de investigación con tecnologías fácilmente aplicables al sector que puedan dar soluciones a este tipo de problemáticas y mejorar por lo tanto, la composición de la leche. Por esta razón, el objetivo de esta investigación es conocer si se presentan deficiencias en Met y Lys cuando se balancea la dieta por proteína metabolizable, así como el efecto de la inclusión de aminoácidos protegidos en la dieta de vacas Holstein para evaluar el efecto sobre el flujo de proteína total hacia el abomaso la producción y composición de la leche, así como también el contenido de las diferentes proteínas lácteas.

Para dar respuesta al objetivo general se presentan seis capítulos. En el segundo capítulo se desarrolla la revisión de literatura, donde se analizan aspectos tales como la composición de la proteína de la leche, el suministro de AA al intestino delgado (ID), las necesidades de AA en vacas lecheras e investigaciones en donde se estudia el suministro AAP a vacas lecheras y sus efectos en los parámetros productivos. A su vez, se muestra en esta revisión algunos estudios con AAP en sistema de pastoreo, los cuales son limitados y escasos, demostrando



la gran importancia del desarrollo de este trabajo investigativo. Con base en esta revisión, se concluyó que en la mayoría de los trabajos de investigación se identifica a la metionina y a la lisina como el primer y segundo AA más limitante para la producción de proteínas de la leche utilizando una amplia variedad de dietas, especialmente las basadas en maíz y torta de soya. En sistemas de pastoreo basado en kikuyo como alimento principal y suplementación comercial se encuentra sólo una publicación donde se indica que el aporte de estos AA hacia el duodeno en la fracción no degradable en rumen es limitada, lo cual podría influir sobre el uso de los AA para la producción de proteínas lácteas. Además, se muestra como el contenido de la mayoría de los AAE de este pasto, es menor que el encontrado en la proteína bacteriana del rumen (Correa, 2006). Sin embargo, es importante tener en cuenta que la composición de los AA de la PNDR de un alimento difiere de la del ingrediente original y, también, que la digestibilidad de los AA de cada alimento es diferente, factores que pueden cambiar la adecuación de una materia prima para la producción de leche y de los cuales no existen tantos datos disponibles como se necesitaría. De hecho, ante la falta de datos, los sistemas oficiales asumen que la digestibilidad intestinal de la proteína alimenticia es constante para todos sus AA (INRA, 1988). En los sistemas especializados de producción lechera en Colombia, no se conoce el flujo de proteína metabolizable (PM) que llega al ID y por lo tanto los estudios sobre estos aspectos y más aún sobre el aporte de AA al ID desde la PNDR usando el perfil de AA después de la degradación ruminal y no el mismo de la dieta pueden considerarse nulos. Así, se evidencia la importancia científica del objetivo de esta investigación destinada a conocer si en los sistemas de producción especializados de leche en Colombia la lisina y la metionina pueden estar limitando la producción de proteínas lácteas con la posibilidad de corregir la deficiencia generada con suplementación de aminoácidos protegidos, metionina y lisina.

El tercer capítulo es relevante e importante para futuras investigaciones en el tema de AA y el mejoramiento en el flujo de proteína metabolizable, dado que se determinó la tasa de pasaje de la dieta, degradabilidad ruminal y digestibilidad de la materia seca (MS), proteína cruda (PC) y AA del pasto kikuyo, de un

suplemento comercial y de AA protegidos (metionina y lisina) comerciales, no comercializados aún en Colombia, pero utilizados internacionalmente en estudios con ganado de leche. De aquí, se obtuvo la información necesaria para ser incluida en el programa Aminocow (AC) y determinar si había o no deficiencias de metionina y lisina en vacas lecheras. Adicionalmente, la evaluación del producto (AA protegidos) utilizado en esta investigación (su contenido de AA, la degradabilidad ruminal, digestibilidad intestinal de la MS, PC y AA) permitió determinar la cantidad a suministrar del producto comercial para cubrir la deficiencia del AA en cuestión.

En el cuarto capítulo, se describe la metodología y los resultados obtenidos en la evaluación del efecto de la suplementación con los AA protegidos Lisina (Lys) y metionina (Met) sobre el consumo de MS, el flujo de proteína metabolizable (desde sus 3 fuentes: proteína no degradable en el rumen, proteína microbiana y proteína endógena absorbibles), la cantidad de Met y Lys metabolizables, y los balances de Met y Lys finales en los animales experimentales. Aquí también son presentados los resultados del efecto de la Met y Lys protegidas sobre la producción y composición de la leche

En el quinto capítulo, se presenta un análisis comparativo del balance de AA que fue realizado antes de la suplementación con los AAP (valores predichos) y luego de la suplementación con estos (valores estimados reales, que llamaremos los valores observados). Lo más importante en este capítulo fue mostrar que si bien existen modelos y programas al alcance de productores y asesores para la estimación del balance de AA (Aminocow, NRC, etc) en vacas lecheras, dichos programas pueden generar valores poco confiables si se utilizan datos de entrada inciertos que resultan pobremente conocidos muchas veces, en los sistemas de producción colombianos. Poder determinar si los valores estimados del consumo de forraje, la producción de proteína microbiana, el suministro de Met, Lys que llegan al intestino delgado y el balance de Met y Lys predichos mediante el programa AC no diferían estadísticamente respecto a los valores observados, los cuales incluyeron datos reales de consumo de MS de forraje y producción de

proteína microbiana de cada uno de los animales incluidos en el trabajo experimental final nos permitió discutir con mayor exactitud los resultados y corregir posibles estimaciones para ser incluidas en los modelos en futuras investigaciones.

Finalmente, en el sexto capítulo se evaluaron los efectos de la suplementación con AAP (Lys y Met) sobre la producción, composición de la leche y la concentración de las diferentes proteínas de la leche, particularmente las caseínas alphaS1, alphaS2, beta, kappa y la proteína del suero, alpha lactoalbúmina.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General:**

Conocer el efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas en vacas lecheras sobre el flujo de aminoácidos al intestino delgado, la producción y cantidad de proteínas lácteas.

### **1.2.2 Objetivos específicos:**

Cuantificar los aportes de los diferentes componentes de la proteína metabolizable en vacas lecheras y evaluar el efecto de la suplementación con AAP sobre esta.

Conocer el efecto de la suplementación con AAP sobre la producción de leche en vacas lecheras en el segundo tercio de lactancia.

Conocer el efecto de la suplementación con AAP sobre la composición de la leche y las concentraciones de los diferentes tipos de caseínas (alpha, beta y kappa) y la proteína del suero de la leche (alpha lactoalbúmina).

### **1.3 Aspectos conceptuales utilizados en el presente trabajo.**

El estudio experimental se realizó asumiendo que la proteína metabolizable proviene de 3 fuentes: proteína no degradada en rumen (PNDR), proteína microbiana (PMicrob) y proteína endógena (PE) y a su vez que los AA que llegan al intestino delgado (ID) son aportados desde estas 3 fuentes. En este sentido y para alcanzar los objetivos específicos planteados y conocer si la suplementación con Met y Lys protegidas puede cubrir las deficiencias de estos dos AA, aumentar el flujo de PM (y por ende el de AA al ID) y mejorar la síntesis mamaria de proteína y caseínas en la leche se diseñaron las siguientes fases del trabajo experimental:

#### **- Fase 1: Determinación de la tasa de pasaje en vacas en pastoreo en raciones a base de pasto kikuyo y concentrado**

Se realizó un trabajo de campo con 2 vacas secas de la raza Holstein provistas de cánula ruminal en la "*Hacienda La Montaña*", ubicada en San Pedro de los Milagros, para determinar la tasa de pasaje y por tanto, el tiempo de retención ruminal de la fracción sólida de la dieta de vacas lecheras consumiendo forraje y suplemento comercial. Esta metodología consistió en marcar la fibra en detergente neutro (FDN) del pasto kikuyo con cromo, introducir esto dentro de la cánula ruminal del animal y posteriormente recolectar las heces durante 4 días consecutivos en diferentes horarios (0, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 36, 48, 60 y 84 h). Finalmente en estas muestras fue determinada las concentraciones de Cromo (Cr).

#### **-Fase 2: Estimación de la degrabilidad ruminal de la MS, PC y AA.**

Una vez determinada la tasa de pasaje y el tiempo de retención ruminal (27.4 h), se realizó la incubación ruminal de los diferentes alimentos de la dieta de las vacas lecheras (pasto kikuyo y concentrado comercial) y las dos fuentes de AAP (Lys y Met), la cual fue realizada en la "*Hacienda La Montaña*", con 2 vacas secas canuladas enrumen. Con estos datos se realizaron las determinaciones de la

degradabilidad ruminal de la MS, PC y AA. Es importante destacar que la estimación de la PNDR y los AANDR dependen del tiempo de incubación ruminal.

### **-Fase 3:**

Con el residuo proveniente de los alimentos y de los AAP después de la incubación ruminal, se realizó nuevamente la determinación de la digestibilidad intestinal de estas fuentes, realizado en la “*Hacienda La montaña*” con las mismas vacas de la anterior fase experimental.

Finalmente, con la fase 1, 2 y 3 se obtuvieron los alimentos y su perfil de AA inicial, los residuos de estos mismos a las 27.4 h (tiempo de retención ruminal determinado en la Fase 1) y los residuos de la digestibilidad intestinal (encontrados en las heces) del kikuyo, concentrado, Met y Lys protegidas. Por diferencias fueron calculadas la degradabilidad y digestibilidad intestinal de la MS, PC y AA para dar cumplimiento parcialmente al objetivo número 1 al poder determinar la cantidad de PNDR y de los AANDR del kikuyo, concentrado y de los AAP, así como los porcentajes de digestibilidad de cada uno de los alimentos evaluados.

### **-Fase 4:**

Se procedió a obtener la información de cada una de las vacas lecheras que serían utilizadas en la experimentación final para calcular los requerimientos y aportes de Lys y Met en cada una de ellas con el programa AC, y de esta manera suplementar los animales con las cantidades adecuadas de dichos AA, si se encontraban deficiencias después de la determinación de los balances. Los cálculos de las cantidades a suplementar de Met y Lys protegidas fueron realizados mediante la fase 1, 2, 3. Es necesario en este punto resaltar que si bien, existen modelos y programas al alcance de productores y asesores nutricionales para la estimación del balance de AA (Aminocow, NRC, etc) en vacas lecheras, estos programas deben ser alimentados con valores confiables para poder obtener adecuadas estimaciones. Sin embargo, valores de entrada

como la proteína microbiana y el consumo de materia seca del forraje son pobremente conocidos en los sistemas de producción colombianos.

**-Fase 5:**

Esta fase experimental fue realizada en la “*Hacienda Betania*” ubicada en Santa Rosa de Osos, donde se tomaron 12 vacas, 6 vacas por tratamiento (Control y Met Lys, este último tratamiento fueron los animales suplementados con AAP). Se evaluaron los efectos del aporte de los AAP sobre el consumo de MS, flujo de proteína metabolizable (PM), producción y composición de la leche.

**-Fase 6:**

Para explicar adecuadamente los resultados obtenidos y si la suplementación fue adecuada o no, fue realizado un análisis para evaluar el grado de ajuste, reproducibilidad y concordancia entre los valores de predicción que fueron realizados antes del experimento de campo y los valores reales estimados (una vez realizada la suplementación con los AA protegidos).

## **CAPITULO 2. REVISIÓN DE LA LITERATURA**

Esta revisión de literatura parte por destacar la relevancia de la leche de vaca para la nutrición humana y la importancia de las proteínas lácteas en la composición de la leche. Se revisan las investigaciones relacionadas con la alimentación de la vaca lechera y el suministro de AA al ID, las innovaciones tecnológicas para aumentar el flujo de AA al ID con AAP y finalmente los estudios realizados con AAP en animales en producción.

### **2.1 Importancia de la leche de vaca y las principales proteínas lácteas**

La leche bovina contiene alrededor de 30 a 32 g de proteína por litro. La proteína de la leche tiene un alto valor biológico, siendo por lo tanto, una buena fuente de AA esenciales. Además, la leche contiene una amplia gama de proteínas con actividades biológicas que van desde actividad antimicrobiana hasta la de facilitar la absorción de nutrientes, así como también contiene factores de crecimiento (enzimas, anticuerpos) y estimula el sistema inmune (Roncada et al, 2012).

La proteína láctea reconoce numerosas proteínas específicas, donde el grupo principal está representado por las caseínas que representan el 80% del total de proteínas. Las caseínas tienen funciones biológicas como portadoras del calcio y el fosfato y formar un coágulo en el estómago para la digestión eficiente de la proteína. Otro grupo de proteínas presentes en la leche son las proteínas del suero. Se trata de proteínas globulares y son más solubles en agua que las caseínas. Sus fracciones principales son la beta-lactoglobulina, alfa lactalbúmina, albúmina del suero bovino y las inmunoglobulinas.

Nuevas investigaciones han mostrado que algunas de las proteínas de la leche (por ejemplo, lactoferrina, antitripsina-1,  $\beta$  caseína y lactoalbúmina) pueden ser relativamente resistentes a las enzimas digestivas, y toda la proteína o los péptidos derivados de ella, pueden ejercer sus funciones en el intestino delgado antes de ser completamente digeridas. Diferentes proteínas y péptidos derivados

de las proteínas de la leche son potenciales moduladores de varios procesos regulatorios en el cuerpo y pueden reducir el riesgo a enfermedades o aumentar ciertas funciones fisiológicas (Clare y Swaisgood, 2000). Como se puede evidenciar la alta calidad de la proteína en la leche de vaca es una de las mayores razones por la cual es un importante alimento en la nutrición humana.

En este punto, es importante describir las principales proteínas lácteas:

-  **$\beta$  caseína.** La  $\beta$ -caseína está compuesta de 209 residuos de AA, entre ellos 35 prolinas, con un peso molecular de 23583.2 Da y un punto isoeléctrico (pI) de 5.13. Esta proteína es muy anfifílica (posee propiedad hidrofílica y lipofílica) y por esto actúa como una molécula con efecto detergente. La proteína de auto asociación depende de la temperatura. Este tipo de proteína es menos sensible a la precipitación con calcio.

La  $\beta$  caseína y sus fragmentos han sido implicados en numerosas funciones biológicas. El péptido caseparana ha sido reportado como activador de la fagocitosis de macrófagos y liberación de peroxidasa. La  $\beta$ -caseína es también una fuente de péptidos de casomorfinas, los cuales exhiben una actividad opioide, uniéndose a los receptores en el lumen intestinal y actuando como moduladores exógenos de la motilidad gastrointestinal, permeabilidad intestinal y liberación de hormonas intestinales, por lo que actualmente existe gran interés por su posible papel beneficioso en el tratamiento de la diarrea (Baró et al, 2001).

-  **$\alpha$ -s1-caseína.** La  $\alpha$ s1-caseína está compuesta de 199 residuos de AA, con peso molecular de 22974.8 Da y un punto isoeléctrico (pI) de 4.91. Esta proteína contiene más AA ácidos que básicos. Tiene 17 residuos de prolina, la cual previenen la formación de cierto tipo de estructura secundaria. Tres regiones hidrofóbicas han sido identificadas que contienen todos los residuos de prolina. Siete de los ocho grupos fosfatos están localizados en la región hidrofílica. Estás



caseínas son sensibles al calcio y precipitan a muy bajos niveles (Kumosinsk et al, 1991)

La  $\alpha$ -s1 caseína es la forma más prevalente de las caseínas en la leche bovina presentando propiedades antioxidantes con eliminación de radicales libres. También ha sido involucrada en el transporte de las caseínas desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi (Chanat et al, 1999). A su vez, esta proteína contiene Caseidina, que exhibe actividad *in vitro* contra *Staphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes* (Clare y Swaisgood, 2000).

-  **$\alpha$ -s2-caseína.** Esta proteína tiene un peso molecular de 24348.55 Da y un punto isoeléctrico (pI) de 8.34. Consiste en 207 residuos con 10 prolinas y 2 cisteínas. Las cargas negativas están concentradas en el N terminal y las cargas positivas más próximas al carbono (C) terminal. Puede precipitar en bajos niveles de calcio. Los fragmentos proteolíticos de la caseína  $\alpha$ -s2 han mostrado que exhiben actividad antibacterial. Específicamente, el fragmento de péptido que tiene 39 AA, la caseidina, ha demostrado inhibir el crecimiento de *E. coli* y *S. carnosus* (Zucht, 1995).

-  **$\kappa$ -caseína.** Contiene 169 residuos de AA (20 prolinas), con un peso molecular de 18974.4 Da y pI de 5.93. A diferencia de las otras caseínas, esta proteína es muy resistente a la precipitación con calcio, estabilizando a las otras caseínas. La función de la  $\kappa$ -Caseína es la orientación en la superficie de la micela de la caseína como una interface entre el interior hidrofóbico de las caseínas y el medio acuoso (se coloca en el exterior de la micela de caseína). Durante la coagulación de la leche, la hidrólisis por la quimosina o renina en el enlace Phe105-Met106 libera el fragmento soluble en agua: el caseinomacropéptido (CMP) y una región hidrofóbica: la para- $\kappa$ -caseína. El clivaje de éste enlace es el primer paso en la coagulación de la leche por agregación de las micelas de caseína después de la pérdida de hidrofiliidad, superficie cargada negativamente de la micela. La

casoxinas A, B y C tienen actividad antagonista a opioides. La casoplatelina inhibe la agregación plaquetaria (Clare y Swaisgood, 2000).

-  **$\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -LA)** Es una pequeña proteína globular que es relativamente estable. Constituye un 21% de las proteínas de suero. La  $\alpha$ -LA está compuesta de 123 residuos de AA, con un peso molecular de 14186.06 Da y pI de 4.80. Esta proteína tiene 8 residuos de cisteína, todos involucrados en los enlaces S-S. Esto le da una estructura secundaria muy ordenada y una estructura terciaria muy compacta. Es una metaloproteína ya que está asociada a un calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por molécula. La molécula tiene una forma elipsoidal con una hendidura profunda dividiendo la proteína en dos partes. Cuatro hélices forman un lado de la hendidura y dos hojas beta-junto con una cadena de bucle. Cuatro enlaces disulfuro hacen que esta proteína sea relativamente estable al calor. Se encontró que la  $\alpha$ -LA es un cofactor en la síntesis de lactosa y las concentraciones de esta proteína y la lactosa en la leche están correlacionados. La cantidad relativa de esta proteína es un requisito para la biosíntesis de lactosa (Kontopidis et al, 2008).

Además, es un aglutinante fuerte de calcio y otros iones, incluyendo Zn (II), Mn (II), Cd (II), Cu (II), y Al (III), y cambia marcadamente la conformación con la unión de calcio (Wong et al, 1996). Una característica interesante de la  $\alpha$ -LA es que parece existir en tres estructuras diferentes: unida al calcio, el complejo libre de calcio y forma A o en bajo pH. Recientemente, esta última forma se ha estudiado intensamente, ya que puede constituir una nueva estructura proteica. Esta estructura de "glóbulo fundido" puede ser intermedia entre las formas nativas y desnaturalizadas de la proteína (Wickström et al, 2010).

-  **$\beta$  lactoglobulina.** Esta proteína está compuesta de 162 residuos de AA, con un peso molecular de 18281.21 Da y pI de 4.83. Es una proteína pequeña, soluble en solución salina como corresponde a una globulina. Es rica en AA sulfurados, contiene 2 enlaces disulfuros y 1 cisteína. La cisteína es muy importante porque

reacciona por el calor con el disulfuro de la K-caseína y afecta la coagulación por el cuajo y la estabilidad al calor de la leche. Es una proteína muy resistente a la proteólisis y actúa como transportador de la vitamina A, además estimula la actividad lipásica. Esta proteína no está presente en la leche humana, por lo que es la proteína de la leche bovina más alergénica para los niños (Sélo et al, 1999).

En la tabla 1 se muestra la composición química de las principales caseínas de la leche. Algunos autores sugieren que las proteínas del suero son generalmente más bajas en glutamato, prolina y metionina y más altas en cisteína, glicina y treonina que las caseínas (Davis et al, 1994).

Tabla 1. Composición química de las caseínas

| Aminoácido        | $\alpha$ s1-CN | $\alpha$ s2-CN | $\kappa$ -CN | $\beta$ -CN |
|-------------------|----------------|----------------|--------------|-------------|
| Asp               | 7              | 4              | 3            | 4           |
| Asn               | 8              | 14             | 8            | 5           |
| Thr               | 5              | 15             | 14           | 9           |
| Ser               | 8              | 6              | 12           | 11          |
| SerP              | 8              | 11             | 1            | 5           |
| Glu               | 25             | 24             | 12           | 19          |
| Gln               | 14             | 16             | 14           | 20          |
| Pro               | 17             | 10             | 20           | 35          |
| Gly               | 9              | 2              | 2            | 5           |
| Ala               | 9              | 8              | 15           | 5           |
| Cys               | 0              | 2              | 2            | 0           |
| Val               | 11             | 14             | 11           | 19          |
| Met               | 5              | 4              | 2            | 6           |
| Ile               | 11             | 11             | 13           | 10          |
| Leu               | 17             | 13             | 8            | 22          |
| Tyr               | 10             | 12             | 9            | 4           |
| Phe               | 8              | 6              | 4            | 9           |
| Trp               | 2              | 2              | 1            | 1           |
| Lys               | 14             | 24             | 9            | 11          |
| His               | 5              | 3              | 3            | 5           |
| Arg               | 6              | 6              | 5            | 4           |
| Pyr o Glu         | 0              | 0              | 1            | 0           |
| Total de residuos | 199            | 207            | 169          | 209         |
| Peso molecular    | 23.623         | 25.238         | 19.006       | 23.988      |

$\alpha$ s1-CN: Alpha S1 caseína,  $\alpha$ s2-CN: Alpha S2 caseína,  $\kappa$ -CN: Kappa caseína,  $\beta$ -CN: Beta caseína.

Fuente: Swaisgood, 1993

Como puede evidenciarse tanto las caseínas como las proteínas del suero de la leche aparte de proporcionar una proteína de muy buena calidad, pueden proporcionar péptidos bioactivos importantes en la salud humana (el Cuadro no muestra esas propiedades. Aclarar o eliminar comentario). Por todo lo expuesto, resulta importante asegurar el contenido y la producción de estas proteínas en la leche, siendo para tal fin importante asegurar una adecuada y estratégica alimentación de la vaca lechera, que asegure los perfiles de AA adecuados en el intestino delgado para una síntesis en glándula mamaria sin limitación en AA.

## **2.2 Alimentación de la vaca lechera. Suministro de aminoácidos (AA) al intestino delgado (ID).**

Con el fin de satisfacer las necesidades de AA para los rumiantes se debe tener un conocimiento básico de cómo se garantiza su suministro y disponibilidad. Las principales fuentes de aminoácidos son: Proteína microbiana, proteína de escape o proteína no degradable en rumen y proteína endógena (Dinn et al., 1998).

Las proteínas del alimento que llegan al rumen son hidrolizadas liberando péptidos y AA por parte de los microorganismos ruminales. Sin embargo, la mayoría de los AA son rápidamente degradados a ácidos orgánicos, amonio y dióxido de carbono. El amonio producido es la principal fuente de nitrógeno para el crecimiento de las bacterias. Algunas especies de bacterias ruminales usan péptidos directamente para la síntesis de proteína microbiana. Se ha indicado que del 40 % hasta el 80 % de las proteínas de la dieta normalmente pueden ser degradadas en el rumen y transformada en proteína microbiana. Esta producción de proteína microbiana en rumen es un mecanismo dependiente de energía y por lo tanto, la cantidad de proteína de la dieta transformada en proteína microbiana resulta un aspecto importante en la economía del nitrógeno en el animal y resulta a su vez afectada por la degradación ruminal por procedimientos artificiales.

Aunque los AA son rápidamente desaminados en el rumen, la población microbiana del rumen deriva del 25 al 50% de su nitrógeno de otras fuentes diferentes al amonio. Estos AA o péptidos presuntamente intactos se originan directamente de la proteína del alimento o del reciclaje de nitrógeno en el rumen o por remoción de proteína de bacterias y protozoos dentro del rumen (Kamalak et al., 2005).

La degradación ruminal de las proteínas puede ser reducida por la disminución en los tiempos de retención en el rumen (mayor velocidad de pasaje) y los factores que influyen en el consumo de alimentos, la gravedad específica, el tamaño de las partículas de la dieta, la relación forraje: concentrado y la tasa de digestión ruminal. De la misma manera que otros nutrientes la cantidad de proteína que alcanza el intestino delgado depende del consumo de alimento.

La degradación de las proteínas por los microorganismos da lugar también a productos intermediarios tales como aminoácidos libres y péptidos en el rumen. La baja concentración de AA libres en el rumen sugiere una rápida utilización por los microorganismos ruminales, los cuales pueden ser asimilados directamente por los microorganismos que los incorporan a sus proteínas, pero la mayoría son desaminados produciendo una elevación del nitrógeno amoniacal y otros productos intermediarios.

La proteína microbiana por sí sola probablemente pueda satisfacer las necesidades del ganado en o cerca del mantenimiento. El ganado joven en crecimiento y las vacas lactantes de alta producción necesitan PNDR además de la proteína microbiana para satisfacer sus requerimientos de PM. El NRC (2001) sugiere que los requerimientos de PM, PDR y PNDR para una vaca lechera Holstein en el segundo tercio de la lactancia, con un consumo de materia seca (CMS) de 20.3 Kg y produciendo 25 litros de leche con una composición de 3.5 % de grasa, 3.0% de proteína verdadera, 4.8% de lactosa son de 1862, 1937 y 933 g/d respectivamente. Siendo, la cantidad de proteína microbiana sintetizada a partir de la PNDR y de la materia orgánica digestible (MOD) de 130 g/Kg de MOD (Alves, 1994, Klopfenstein, 1996, Lapierre et al., 2006).

En cuanto a la utilización de AA en rumiantes, en comparación con aves y cerdos se halla que las vacas lecheras resultan bastante ineficientes en la conversión de Nitrógeno (N) a proteína láctea o músculo. Algunos autores establecen que el porcentaje apenas es del 25% del N consumido. Por lo tanto, las vacas lecheras utilizan sólo una cuarta parte del N de la dieta para la síntesis de proteínas, mientras que el restante se pierde en orina y las heces. Esta pérdida de N es una pérdida económica significativa para los productores lácteos, ya que la proteína es el nutriente más caro para la alimentación de las vacas lecheras. Además, la orina y las heces han sido reconocidas como fuentes críticas de contaminación ambiental. Por lo tanto una mejora en la eficiencia de utilización del N de manera significativa podría reducir las contribuciones de la producción lechera a la contaminación del medio ambiente (Bequette et al, 2003). El uso de una amplia variedad de alimentos, la transformación de nutrientes en el rumen, y la falta de conocimiento sobre el metabolismo después de la absorción de los AA contribuye a predicciones erróneas en los requerimientos de los AA en las vacas lecheras (Lapierre et al., 2006). Esto ocasiona que la estimación de los requerimientos de proteína sean demasiado altos en relación a las verdaderas necesidades de las vacas lecheras induciendo una alimentación nitrogenada excesiva a los animales.

Los requerimientos de AA en las vacas lecheras son típicamente expresados como la necesidad total de AA, es decir, la PM. Esta definición exige que la PM este por encima de los requerimientos e incluya un margen de seguridad importante para garantizar un suministro adecuado de AA para una producción máxima de leche.

Por otro lado, algunos estudios sugieren que hay limitaciones inherentes para la traducción de proteínas en la glándulas mamarias bovina (Moshel et al., 2006). Dado que la tasa de síntesis de proteínas depende de la tasa de traducción y de la absorción de AA por la glándula mamaria, y esta parece estar correlacionada positivamente con la eficiencia en la traducción (Bequette et al., 2003), estas limitaciones probablemente reducen la captación o absorción de AA por la

glándula mamaria permitiendo que los AA sean catabolizados por otros tejidos. Los tejidos espláncnicos pueden eliminar hasta un 60% del suministro diario de los AA absorbidos y la utilización de estos es directamente proporcional a las concentraciones plásmaticas de los AA que entran a la circulación sanguínea. Dado que las concentraciones de AA en la sangre reflejan el balance de la absorción, catabolismo y anabolismo, el catabolismo espláncnico de AA puede reducirse cuando la cantidad absorbida desde el ID es baja o cuando se aumenta la utilización de los AA para el anabolismo en las células del epitelio intestinal. La alimentación con dietas bajas en proteínas reduce el flujo de AA en la sangre y aumenta el uso anabólico para la síntesis de proteínas de la leche, lo cual incrementa la remoción de AA desde la sangre (Hanigan et al., 2005). Por lo tanto, una estrategia de alimentación que combine estos conceptos debe disminuir el catabolismo de AA y mejorar la eficiencia de N en vacas lecheras. Vacas alimentadas con dietas bajas en proteína cruda (PC) y suplementadas con AA limitantes para la síntesis de proteínas de la leche ha sido reconocido como una estrategia prometedora para mejorar la eficiencia de uso del N, sin comprometer la producción de leche de las vacas lecheras (Lapierre et al., 2006).

Lo anterior hace que la identificación de los AA potencialmente críticos para la síntesis de proteínas de leche sea de gran importancia. Además de ser precursores para la síntesis de proteínas, los AA también regulan las tasas de traducción. Tradicionalmente, se ha pensado que la Lys y Met son limitantes basados en la disponibilidad de sustrato. Sin embargo, el desarrollo de la comprensión de la función reguladora de los AA en la síntesis de proteínas nos lleva a pensar de otra manera. Actualmente, diversos autores sugieren que las deficiencias de Met y Lys por si mismas, pueden representar una falta de estímulo en la síntesis de proteínas de la leche y que las dietas basadas en maíz y torta de soya puedan inducir un aporte limitado de Lys y Met (Kimball 2005).

La mayoría de señales inducidas por los AA son transmitidas a través de la proteína quinasa, y el gen diana de rapamicina en células de mamífero (mTOR) (Proud, 2004). Las señales de los AA mediadas por el mTOR para la síntesis de

proteínas se ha estudiado a fondo en las células musculares (Moshel et al., 2006). Los AA, en particular la leucina, activan el mTOR por fosforilación. Una vez activado, el mTOR directamente fosforila la proteína ribosomal S6 (rpS6) quinasa (S6K1) y el factor de iniciación eucariótico 4E unido a la proteína 1 (4EBP1), y media la desfosforilación del factor de elongación eucariótico 2 (eEF2) (Proud, 2004). Aumentos de la fosforilación rpS6, S6K1 y 4EBP1 y desfosforilación de eEF2 están asociados con el aumento de las tasas de síntesis de proteínas musculares. Además de las hormonas, en particular de la insulina, sustratos energéticos como la glucosa también regulan la síntesis de proteínas musculares. Estas señales son, respectivamente, mediadas por la proteína quinasa B (PKB / Akt) y el sensor de energía celular, AMP-activado por la proteína quinasa (AMPK). De la misma forma, se ha establecido que los AA presentan las mismas rutas de señalización celular en la glándula mamaria para la producción de las proteínas lácteas. Por lo tanto, el conocimiento de estos procesos podría llevarnos a pensar en una estrategia de alimentación que mejore la eficiencia en la utilización del N en vacas lecheras. Por otra parte, el conocimiento de los posibles efectos de regulación de los AA y sus interacciones con los sustratos energéticos como la glucosa y el acetato, más la presencia de la insulina podrían permitir mejorar la representación matemática de los requerimientos de AA en las vacas lecheras.

Ahora bien, los aminoácidos esenciales (AAE) para el ganado lechero tienen que ser aportados en la dieta debido a que estos no son sintetizados en las tasas adecuadas para cumplir con los requerimientos del animal. Arginina (Arg), Histidina (His), Leucina (Leu), Metionina (Met), Lisina (Lys), Fenilalanina (Phe), Treonina (Tre), Triptófano (Trp) y Valina (Val) son reconocidos como los AAE en las vacas lecheras (Schwab et al, 1976).

Lapierre et al (2006) señalan que se deben mejorar las representaciones y el entendimiento en el metabolismo pos-absorción de los AAE en los actuales modelos de estimación de los requerimientos proteicos. En cuanto al metabolismo post-absorción de los AA y la eficiencia en la utilización del N, es importante destacar que después de salir de los tejidos intestinales, los AA primero fluyen



hacia el hígado, donde pueden estar sujetos a un metabolismo sustancial (Lapierre et al, 2006). Cuando los AA llegan al hígado, pueden pasar directamente a través de dicho órgano y estar disponibles para los tejidos periféricos. Sin embargo, también pueden ser removidos desde la sangre y ser incorporados en las proteínas del hígado estando pues sujetos a su utilización y oxidación hepática (principalmente de alanina y glutamina para la gluconeogénesis) (Baquette et al, 2003).

La afinidad del hígado por los AA es baja, solamente de 0 a 10% de los AA en circulación sanguínea están siendo removidos en el primer paso por este órgano. De esta manera, la mayoría de los AA absorbidos llegan a la sangre arterial. Sin embargo, el 50% de AA sistémicos recirculan hacia el hígado, siendo estos los AA no utilizados para propósitos productivos (producción de proteínas en leche) o catabolizados por los tejidos periféricos, los cuales son reciclados en el tejido esplácnico (Hanigan, 2005). Los AA de cadena ramificada (AACR) como son la Leu, Iso, Val exhiben una remoción hepática mínima de aproximadamente 1%. En contraste, cantidades sustanciales de His, Met y Phe que son removidos por el hígado y sujetos a oxidación y síntesis de proteínas (Bequette et al, 2003).

En las células mamíferas, el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (AACR) involucra dos aspectos principales. El primero es la transaminación irreversible de los AACR catalizados por la aminotransferasa de cadena ramificada. En el segundo paso, los cetoácidos de cadena ramificada son oxidativamente descarboxilados para producir el correspondiente derivado de acil-CoA de cadena ramificada. Esta reacción irreversible es catalizada por el complejo enzimático ceto acil deshidrogenasa de cadena ramificada mitocondrial (KDCR). Dado que el hígado carece del primero de estos dos complejos enzimáticos, es incapaz de catabolizar los AACR y así casi todo el suministro dietario de AACR pasa a través del hígado y estará disponible para los tejidos periféricos tales como el músculo y la glándula mamaria.

Sobre la absorción de los AA por la glándula mamaria (GM), Mephram (1982) afirmó que puede depender de 3 factores: la concentración arterial de los AA, el

flujo sanguíneo mamario y la funcionalidad de los transportadores o los sistemas de transporte en la membrana basal de las células secretoras (Lapierre et al, 2006). Madsen y colaboradores (2005), observaron que los suplementos dietarios de la Lys y Met protegidos incrementaron las concentraciones de lisina y metionina arteriales, pero la absorción mamaria de estos AA no cambió en cabras lactantes. Bequette y colaboradores (2000) concluyeron que las células de la GM pueden ajustar la absorción de AA, independientemente de sus concentraciones plasmáticas, por el control del flujo de sangre mamaria. Estos autores observaron un incremento (33%) del flujo sanguíneo mamario en respuesta a los bajos niveles de histidina plasmática en cabras. Además, la capacidad de la GM para remover His incrementa 43 veces, mientras que la capacidad de la GM para remover otros AA disponibles abundantemente disminuye de 2 a 3 veces. Estas observaciones sugieren que la absorción de AA en la GM es una función del metabolismo interno y no una simple concentración plasmática. Shotwell et al., (1982) concluyen que la actividad de algunos sistemas de transporte depende de las concentraciones de AA intracelulares, lo cual está determinado principalmente por la traducción o la tasa de síntesis de la proteína. Guan et al., (2004) también reportan una correlación positiva entre la absorción de AA y su demanda para la síntesis de proteína en la leche en la GM porcina.

Los AA una vez que entran a las células pueden participar en varios procesos: 1. Síntesis de proteína en la leche. 2. Síntesis de otras proteínas (por ejemplo, proteínas estructurales y enzimas) o 3. Reacciones catabólicas (por ejemplo de oxidación). Adicionalmente, los AA pueden pasar sin cambios a la leche, sangre o linfa (Mephram, 1982).

La GM tiende a extraer AACR en exceso comparado a sus requerimientos para la síntesis de proteínas. El exceso de AACR presumiblemente sea catabolizado por oxidación en la GM (Hanigan et al, 2005). La expresión de la actividad de ATCR (aminotransaminasa 1 de cadena ramificada) y KDCR ha sido reportada con incrementos significativos en la GM durante la lactancia. Además de los AACR, la GM también tiende a extraer arginina y Lys en exceso. A pesar de que la Lys es

considerada un AA limitante para la síntesis en vacas lecheras cuando están alimentadas con raciones a base de maíz, parece ser casi siempre absorbida en exceso por la ubre (Bequette et al, 2003).

Annison y Linzell (1964) sugieren que de un 24 a 44% del CO<sub>2</sub> producido en la GM de cabras no podía ser explicado por la oxidación de glucosa o acetato. Esto indica que los AAE también son utilizados como fuentes de energía y que algunos de ellos actúan como precursores de nitrógeno (N) para diferentes aminoácidos no esenciales (AANE) (Merpham, 1982). Por otra parte, se ha encontrado óxido nítrico sintetasa (NOS) en el endotelio vascular y epitelio secretor de la GM bovina, enzima que resulta importante porque cataliza la reacción que convierte la arginina a óxido nítrico involucrado en la regulación del flujo sanguíneo. Por lo tanto, el exceso de arginina puede también actuar como precursor del óxido nítrico en la GM bovina (Lapierre et al, 2006).

La extracción de Phe, Met, Thr e His por la GM parece aproximarse más a las cantidades requeridas para la producción de la proteína láctea (Bequette et al., 2003). Por otra parte, en cultivos de células mamarias bovinas se ha observado que la Met y la Thr son limitantes para la síntesis de proteínas lácteas. Un gran número de estudios han demostrado que la suplementación con Met sola o junto con Lys, mejoran significativamente la síntesis de proteína en leche en vacas con dietas basadas en maíz (Weekes et al., 2006).

Clark (1975) menciona que las vacas de alto potencial de producción, dejan de producir a su máxima capacidad genética cuando el suministro de nutrientes resulta limitado. Considerando a los AAE como “nutrientes claves”, Mephram (1982) indica que aunque los mismos estén presentes, su transferencia a la proteína podría estar limitada por una inadecuada estimulación como alguna carencia de una hormona clave para la síntesis de proteína. Más recientemente, Moshel et al., (2006) indican que hay limitaciones de la GM a nivel de la traducción del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) cuando hay deprivación de AA o Leu para la fosforilación de 4E-BP1 o S6K1 y la síntesis de beta-lactoglobulina en células de la glándula mamaria bovina.

Christophersen et al (2002) observaron que algunos factores proteicos involucrados en la traducción del RNAm fueron más críticos para la síntesis de proteína en leche que para la síntesis de proteínas musculares o del hígado en vacas lecheras. Por otra parte, Torien y Cant (2007) concluyen que algunos factores proteicos críticos para la traducción del RNAm no están presentes en una forma activa máxima en la GM. Todas estas observaciones sugieren que además de la alimentación adecuada de proteína en el alimento, algunas limitaciones fisiológicas en la traducción de la proteína de la leche pueden también ser responsables de la pobre utilización del N en vacas lecheras. Por lo tanto, se debe entender adecuadamente los mecanismos de traducción del RNAm en las células mamarias (Torien y Cant, 2007).

### **2.3 innovaciones tecnológicas para aumentar el flujo de aminoácidos al intestino delgado: aminoácidos protegidos.**

El uso de AAP, en contraste con las proteínas protegidas, no reduce el exceso de amoníaco en el rumen. Su eficacia depende de la optimización del suministro de aminoácidos y el patrón de aminoácidos que llega al intestino. Cuando los AAP son utilizados, la respuesta esperable es sobre los principales parámetros de producción tales como cantidad y composición de la leche producida, tasa de crecimiento y eficiencia de utilización del N, generando menor estrés o sobrecarga hepática en el animal (Nichols et al., 1998, Socha et al., 2005, Torre y Caja, 2004).

Para animales de baja tasa de crecimiento o producción de leche, los requerimientos en AA pueden ser satisfechos principalmente por la proteína microbiana la cual presenta un buen balance en AA. La deficiencia de AA solo se espera que ocurra en animales de alto desempeño (nivel productivo).

Un recurrente tema de estudio es poder establecer cuáles AA son limitantes para la producción y en particular con respecto a lactancia ya que los aminoácidos secretados en la leche pueden ser fácilmente cuantificados. Diversas técnicas han sido utilizadas en estos estudios, tales como la comparación en el patrón de AA

bacterianos y las proteínas de la leche, cambios en el contenido de AA en sangre después de la infusión de caseína y diferencias arteriovenosas a través de la glándula mamaria. La conclusión de estos estudios indica que la Met siempre fue incluida dentro el grupo de los AA más limitantes, seguida muy estrechamente por la Lys, histidina, fenilalanina y aminoácidos de cadena ramificada (Kim et al., 1999).

Investigaciones adicionales han desarrollado métodos para prevenir la digestión fermentativa como es la manipulación estructural para producir análogos de aminoácidos y el revestimiento con materiales resistentes (Chalupa et al., 1996). Varios análogos de aminoácidos han sido evaluados en su capacidad de resistencia a la degradación ruminal. Uno de los AA más estudiados es el análogo hidroximetionina. Los resultados de las pruebas han sido variables, con mejoras ocasionales en la producción y grasa en la leche (Kung, 1996).

La Met y otros AA pueden ser protegidos de la degradación bacteriana en el rumen por métodos mecánicos o químicos, a fin de que puedan ejercer sus efectos beneficiosos sobre la producción. El uso de ambos procesos ha dado lugar a productos comerciales. Los AA han sido recubiertos con compuestos poliméricos, proteínas formuladas, grasa, mezcla de grasa y calcio, mezcla de grasa y proteína, y con sales cálcicas de ácidos grasos de cadena larga (Chalupa et al., 1996).

En una serie de experimentos donde la Lys y la Met protegidas han sido utilizadas para aumentar el contenido de proteínas y producción de leche se observaron respuestas moderadas y variables en términos de la producción de leche. Sin embargo, se detectaron respuestas positivas pequeñas pero consistentes en la concentración de proteína de la leche. En estas situaciones, el suministro basal de AA puede ser diferente entre los experimentos evaluados lo cual explicaría en parte la variabilidad en las respuestas obtenidas. Sin embargo, la administración de suplementos de Met no ha sido exitosa en algunas ocasiones para producir el aumento esperado en el nivel de producción de leche y contenido de proteínas o el crecimiento (Polan et al., 1991, Socha et al., 2005, Wu et al., 1997).

En general el suministro de aminoácidos protegidos y su llegada al intestino delgado, parece ofrecer algunas posibilidades para aumentar la producción de leche y la concentración de proteína. Sin embargo, puede ser necesario complementar dicho aporte con una serie de aminoácidos esenciales y no solamente con uno o dos con el fin de obtener una respuesta significativa (Kamalak et al., 2005).

#### **2.4 Alimentación de la vaca lechera con una dieta basada en pasto kikuyo y suplemento comercial. Limitantes en la producción de proteína metabolizable.**

Los sistemas especializados de producción de leche en Colombia, están basados en pasto kikuyo y suplemento comercial (Castañeda et al., 2008), siendo los contenidos de PC tanto para el forraje como para el concentrado mayores al 20%, así en la etiqueta de este último se haya establecido con un mínimo de proteína del 18% (Correa 2006). Esta proteína del forraje, ha sido incrementada por la fertilización nitrogenada, la cual aumenta la fracción *a* o soluble, que corresponde al N soluble y NNP del forraje y va en detrimento de la fracción *b*, que es la potencialmente degradable (Correa, 2006).

Carulla (1999), por otra parte sustenta que los forrajes aportan PDR para la síntesis de P<sub>Microb</sub> y P<sub>NDR</sub>, pero en general pastos como kikuyo y ryegrass son bajos en P<sub>NDR</sub> (20%) y altos en PDR (80%). Adicionalmente, parte de esta proteína que pasa al ID no está disponible para su absorción debido a que se encuentra ligada a la fibra insoluble en detergente ácido (NIDA). Esto, evidencia posiblemente la limitada cantidad de P<sub>NDR</sub> desde el alimento que llega al intestino delgado de las vacas lecheras. Pocos estudios se han llevado a cabo para establecer la composición de aminoácidos del pasto kikuyo. Correa (2006) expone que hay información limitada sobre el contenido de AA en este forraje. Sin embargo, en su revisión muestra como el contenido de aminoácidos esenciales (AAE) de este pasto es menor cuando se compara con el contenido encontrado en la proteína microbiana, lo cual es de gran importancia cuando se pretende

establecer AA que pudiera ser limitantes para la producción de proteína en la leche (Ver Figura 1).

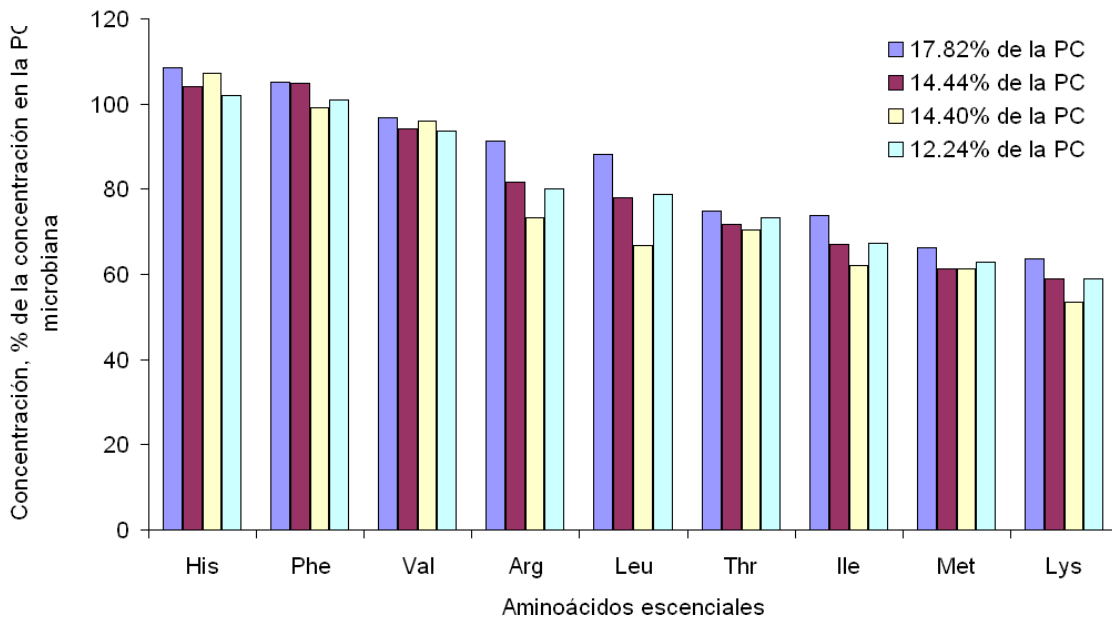


Figura 1. Contenido de aminoácidos esenciales en el pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) como porcentaje de los AA en la proteína bacteriana en el rumen. Tomada desde Correa (2006).

Cómo puede observarse desde la Figura 1, el pobre perfil de AAE en el pasto kikuyo indica una limitación en su aporte hacia el duodeno en la fracción no degradada en el rumen, siendo los AAE con menor concentración relativa la lisina, metionina, isoleucina, treonina, leucina, arginina y valina. Solamente el contenido de fenilalanina e histidina en el pasto kikuyo superan el encontrado en la proteína bacteriana del rumen. Esto es de suma importancia no solo por el hecho de que este pasto es el más utilizado en los sistemas de producción intensiva de leche en Antioquia y otras zonas del país, si no, además por el hecho de que este pasto representa un porcentaje relativamente alto de la dieta de las vacas lactantes (Correa, 2006).

## 2.5 Estudios realizados con aminoácidos protegidos en animales en producción

En un estudio con 8 vacas Holstein en la lactancia temprana y usando un cuadrado latino 4 X 4 repetido, los animales recibieron los siguientes tratamientos:

control; control más aminoácidos protegidos ruminalmente (15 g de metionina y de 20 g lisina), control más adición de grasa (0.32 kg 60: 40 mezcla de origen animal y vegetal y 0.36 kg de jabones cálcicos), control más aminoácidos protegidos ruminalmente más adición de grasa. El objetivo fue evaluar el efecto de las formas protegidas ruminalmente de lisina y metionina y de la grasa dietaria en la producción y composición de la leche. Las vacas fueron alimentadas ad libitum y el consumo total de la dieta mezclada fue de 50% de forraje y 50% de concentrado en base a la MS. La adición de grasa aumento la producción de leche, de grasa, y la producción de leche corregida al 4% de grasa, pero disminuyó el porcentaje de proteína en leche. Los aminoácidos protegidos ruminalmente incrementaron la concentración proteica de la leche. El efecto combinado del aporte de grasa suplementaria y aminoácidos protegidos ruminalmente, aumentaron el porcentaje de grasa láctea y la producción, más que la sola adición de cada suplemento. La adición de grasa incrementó el porcentaje y la producción de ácidos grasos de cadena larga en la leche y los niveles de ácidos grasos libres en plasma. Finalmente, se concluye que la adición de aminoácidos protegidos ruminalmente a dietas suplementadas con grasa puede ayudar a evitar la depresión de la proteína en la leche encontrada en éste tipo de dietas (Canale et al., 1990).

De manera similar, en otro estudio donde el objetivo fue evaluar la interacción entre la suplementación con metionina más lisina protegida y la naturaleza de las proteínas en la dieta, se utilizaron 16 y 12 vacas lecheras multíparas, en 2 ensayos de 8 a 12 semanas de duración respectivamente, comenzando aproximadamente a los 40 días de lactancia. En el trabajo 1, las vacas recibieron una dieta semicompleta más alimento concentrado. La dieta consistía de 62 a 63% de ensilaje de maíz, 2.2% de harina de gluten de maíz, 4% de urea, 11% de torta de soya (no tratada o tratada con formaldehído) y 23 a 24% de grano de cebada. En el trabajo 2, las vacas recibieron una dieta completa con ensilaje de maíz, harina de soya no tratada o tratada con formaldehído, y cebada en una relación 78:12:9:0 o 49:13:4:33. Todos los tratamientos fueron replicados en un cuadrado latino 4X4.



En ambos trabajos, la metionina más lisina (10 g/d de metionina disponible intestinalmente y 30 g/d de lisina) no tuvieron efecto significativo en el consumo de materia seca (CMS), la producción de leche, el contenido de grasa, de caseína expresada como porcentaje de proteína verdadera o el contenido de urea en leche. El incremento en la producción de proteína en la leche fue de 46 g/d, con metionina más lisina y el incremento promedio del contenido de proteína verdadera fue de 1.1 g/Kg de leche. El incremento en el contenido de proteína verdadera en la leche fue más grande para las vacas que recibieron una dieta con baja energía. La fuente de proteína no afectó la producción o composición de la leche. La glucosa, urea, ácidos grasos no esterificados (AGNES), betahidroxibutirato (BHB) y AA libres totales en plasma no fueron afectados por la suplementación de Met más Lys protegidas ruminalmente. Sin embargo, las concentraciones de ambos AA en sangre fueron leve pero no significativamente incrementadas en las vacas suplementadas (Colin-Schoellen et al., 1995). Los resultados sugieren ausencia de trabajos suficientes como para establecer con claridad si el aporte suplementario de AA protegidos de la degradación ruminal resulta una herramienta útil para incrementar el tenor proteico y la producción de leche.

En investigaciones realizadas con ovejas se evaluó el efecto del nivel de metionina protegida ruminalmente (MetP) o lisina (LysP) en la composición de los AG en la leche de ovejas de Comisana. Los animales parieron en otoño y fueron separados de sus corderos 7 semanas después del parto: ellos fueron divididos en 5 grupos de 9, a los cuales se les dieron diferentes raciones. El grupo control fue alimentado con una mezcla de arveja y heno de avena con un concentrado peletizado, a los otros grupos se les dio la ración control suplementadas MetP ( $3 \pm 5$  o  $7 \pm 0$  g/kg) o LysP ( $10 \pm 5$  o  $21 \pm 0$  g/kg). La composición de AG fue determinada por cromatografía de gases, y estos valores fueron sometidos a análisis de componentes principales. Se encontró correlación entre la composición de AG y la dieta. Por tanto, se demostró que la administración de las dietas experimentales afectó significativamente la grasa en la leche, en una medida que es independiente de los niveles de aminoácidos suplementados. La grasa de la

leche del grupo control contenía en gran parte ácidos caprílico, cáprico y láurico, mientras que la de los grupos suplementados con aminoácidos contenían gran parte de ácido palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico. Comparado con el grupo control, la suplementación con AAP aumentó los contenidos de C16:0, C16:1 y C18:0 de un 5-8%, redujo los contenidos de C4:0 y C6:0 en un 5 a 10% y de C8:0, C10:0 y C12:0 de 12 a 20% en la grasa de la leche de los animales suplementados. Este efecto, fue atribuido en parte a la capa de lípidos de los AAP y a una participación directa de estos dos AA en el metabolismo de las grasas y la síntesis de lipoproteínas en sangre, lo que mejoraría el transporte de lípidos y por lo tanto, el suministro de estos hacia la glándula mamaria (Sevi et al., 1998). Otro estudio, en el que fue utilizadas cabras para leche de raza alpina se evaluó el efecto del aporte suplementario de met protegida (Mepron<sup>R</sup>) sobre la producción y composición de la leche en tres explotaciones diferentes. El aporte suplementario de met protegida afectó positivamente la producción de leche sin afectar el contenido proteico y graso de la misma y la magnitud de respuesta podría interactuar con el estado de lactancia y la composición de la ración (Polji ak-Milas y Marenjak, 2007). Los cambios en las fracciones proteicas inducidos por el aporte de met merecen ser estudiados experimentalmente. Adicionalmente, los autores sugieren que debe hacerse un control periódico en los metabolitos sanguíneos y minerales durante la suplementación ya que el aumento de la producción podría cambiar no sólo el status mineral, sino también el status antioxidante de los animales (Polji ak-Milas y Marenjak, 2007).

En otra investigación, en la cual se realizó un meta-análisis de 35 estudios se encontró que en general el suministro de metionina protegida aumentó la producción de proteína verdadera en leche, tanto en porcentaje (0.07%) como en rendimiento (27 g/d). El consumo de materia seca y el porcentaje de grasa en leche se redujeron ligeramente mientras que la producción de leche aumentó. Sin embargo, más estudios de dosis-respuesta en amplios rangos de producción de leche y en diferentes dietas resultan necesarios para establecer con mayor claridad los requerimientos de AA y para poder predecir las respuestas a la suplementación con Met protegida (Patton, 2010).

En otro estudio reciente de revisión se evaluaron 54 experimentos que comparaban una dieta control vs otra conteniendo Met protegida. Doce experimentos compararon el tratamiento control vs. Lys protegida y 47 comparaban una combinación de ambos AA. Los resultados indicaron que el aporte de Met adicionada a los suplementos, aumentó la producción de energía de la leche como también las proteínas de la leche y su tenor graso mientras que se incrementó el nitrógeno dietario capturado como N en leche. La suplementación con Lys protegida disminuyó el consumo de materia seca e incrementó la eficiencia expresada como la relación leche/consumo de materia seca. La suplementación con Lys protegida y la combinación de ambos AA protegidos incrementó la producción y la energía secretada en la leche, el tenor proteico, la proporción de N dietario capturado como N en leche y la eficiencia de conversión alimenticia (leche/consumo de MS). Sin embargo, la magnitud de estos cambios resultó pequeña siendo el incremento más importante de un 3,9% para la captura del N como N en leche ante el aporte de ambos AA protegidos (Robinson, 2010). El trabajo, sugiere que los niveles de Lys y Met disponibles en duodeno son modificables con la fuente de proteína dietaria utilizada pero que la manipulación de las proporciones de Lys y Met en el duodeno tiene pequeños impactos en el rendimiento de vacas lecheras. Los resultados también confirman que la Met y la Lys son el primer y segundo AA más limitantes en la síntesis de proteína en leche para una amplia variedad de condiciones de alimentación.

En la tabla 2, se resumen algunas de las investigaciones realizadas para evaluar el efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas sobre el CMS, producción y composición de la leche. Por otra parte, en la Tabla 3 se presentan dos investigaciones evaluando los efectos de la suplementación con Met o Met y Lys en sistemas de pastoreo. Estas investigaciones son muy escasas y representan una limitante para establecer con precisión los efectos de los AAP sobre la producción y composición de la leche.

Tabla 2. Estudios realizados para evaluar el efecto de la suplementación de Lys y Met sobre CMS, producción y composición de la leche

| Estudio<br>(Fuente<br>Bibliográfica) | Tratamientos               | No. de<br>animales                 | Cantidad<br>suplementada                                       |           | Consumo<br>CMS <sub>t</sub> | Dieta   |        | Duración<br>del<br>experimento                          | Resultados  |
|--------------------------------------|----------------------------|------------------------------------|--|-----------|-----------------------------|---|--------|---|---|
|                                      |                            |                                    | Lys (g/d)  | Met (g/d) |                             | Tipo dieta  | PC (%) |   |   |
| Canale et al<br>(1990)               | Control                    | 8 vacas<br>Holstein<br>(diseño CL) | 0  | 0         | 25.3                        | TMR (forraje:<br>Concentrado): 50%-50%  | 16.9   | Cada período<br>de 21 días,<br>últimos 10<br>de colecta | % de proteína incrementó significativamente con R   |
|                                      | MetLys                     |                                    | 20   | 15        | 24.4                        |   | 16.91  |   |   |
|                                      | Control + grasa            |                                    | 0  | 0         | 24.4                        |   | 17.11  |   |   |
|                                      | Control + Grasa+<br>MetLys |                                    | 20   | 15        | 24.6                        |   | 17.10  |   |   |
| Guillaume et<br>al (1991)            | Control                    | 57 vacas<br>(factorial<br>2X2)     | 0  | 0         | 22.3                        | Ensilaje de alfalfa y de<br>maíz  | 16.73  | 128 días  | No se afectó la producción de leche, proteína de la<br>caseínas, CMS, peso vivo y condición corporal  |
|                                      | MetLys                     |                                    | 40   | 15        | 18.9                        |   | 16.56  |   |   |
| Armentano et<br>al (1997)            | Control                    | 16 vacas (CL<br>4X4)               | 0  | 0         | 26.1                        | TMR, 50% concentrado,<br>40% alfalfa, 10% ensilaje<br>de maíz   | -      | 21 días   | No se afectó CMS, producción de leche, concentrac<br>de la leche, ni proteína   |
|                                      | MetLys                     |                                    | 14.7   | 11.5      | 26.1                        |   | -      |   |   |
| Liu et al 2000                       | CDG                        | 12 vacas<br>Holstein (CL<br>4x4)   | 0  | 0         | 28.4                        | 30% ensilaje de maíz, 20%<br>heno alfalfa, 50% mezcla<br>de concentrado, CDG-<br>Granos de destilería o<br>BLEND- 25%CDG,<br>25%harina de pescado y<br>50%torta de soya | 16.6   | 4 semanas (1<br>ajuste dieta,<br>2-4 toma de<br>datos)  | No afectó el CMS, producción de leche y grasa de la<br>proteína en leche tendió a ser más alto con MetLys<br>concentración de proteínas lácteas similares aunqu<br>lactoglobulina incrementó ligeramente en dieta BL<br>Met mejoró con la adición de Lys. Alto CMS del alim<br>posiblemente exceso de AA, ocultando las diferenc<br>entre fuentes evaluadas |
|                                      | BLEND                      |                                    | 0  | 0         | 27.8                        |   | 16.5   |   |   |
|                                      | CDG+ MetLys                |                                    | 50   | 15        | 27.7                        |   |        |   |   |
|                                      | BLEND + MetLys             |                                    | 50   | 15        | 27.3                        |   |        |   |   |
| Robinson et<br>al (2000)             | Control                    | 4 vacas (CL<br>4x4)                | 140% del requerimiento<br>de la PDI (infusión vía<br>abomasal) |           | 23.8                        | TMR (ensilaje timothy,<br>ensilaje de maíz,<br>concentrado)   | 14.43  | 28 días   | CMS más bajo, producción de leche y lactosa marca<br>bajos y producción de proteína tendió a ser más ba<br>MetLys. Producción de grasa de la leche no fue influ<br>infusión con algún AA. Efecto negativo (140-150%<br>requerimiento PDI)   |
|                                      | Met                        |                                    | 21.85  | 14.44     |                             |   |        |   |   |
|                                      | Lys                        |                                    | 23.12  | 14.42     |                             |   |        |   |   |
|                                      | MetLys                     |                                    | 21.97  | 14.43     |                             |   |        |   |   |

Tabla 2 (Continuación)

| Estudio<br>(Fuente<br>Bibliográfica) | Tratamientos       | No. de<br>animales   | Cantidad<br>suplementada |           | Consumo<br>CMSt | Dieta<br>Tipo dieta  | Duración<br>del<br>experimento   | Resultados   |       |
|--------------------------------------|--------------------|--|--------------------------|-----------|-----------------|--|--|--|-------|
|                                      |                    |  | Lys (g/d)                | Met (g/d) |                 |  |  |  |       |
| Socha et al<br>(2005)                | Control - 18.6% PC | 84 vacas<br>Holstein<br>(bloques al<br>azar)                     | 0                        | 0         | 23.9            | Maíz y suplemento<br>proteico, productos de<br>soya y harina de sangre | 105 días<br>postparto  | Comparado con la dieta control y Met, MetLys<br>producción de leche corregida por energía, gr<br>Hubo tendencia a incrementarse la producción<br>corregida por grasa al 3.5%. Interacción signific<br>AA fue observada para contenido de proteína<br>suplementación con 16% PC en la dieta con M<br>efecto en el contenido de proteína verdadera<br>Met y AAPR en 18.6% PC incrementaron el con<br>por 0.21 y 0.14 unidades porcentuales respect |       |
|                                      | Met -18.6%C        |  | 0                        | 10.5      | 22.6            |  |  |  | 18.6  |
|                                      | AAPR-18.6%         |  | 16                       | 10.2      | 24.2            |  |  |  | 18.6  |
|                                      | Control - 16% PC   |  | 0                        | 0         | 23.5            |  |  |  | 16    |
|                                      | Met -16%C          |  | 0                        | 10.5      | 23.1            |  |  |  | 16    |
|                                      | MetLys-16% PC      |  | 16                       | 10.2      | 24.3            |  |  |  | 16    |
| Třináctý et al<br>(2009)             | Control            | 4 vacas (CL<br>4x4)  | 0                        | 0         | 20.83           | Ensilaje de maíz, heno<br>lucerna y suplemento                         | Cada período<br>de 14 días<br>(10<br>adaptación y<br>4 de toma de<br>muestras) | Mayor consumo de PC, EE, cenizas, FDN, FDA,<br>MetLys vs. el control o Lys (p<0.05). Pdn de le<br>MetLys comparada con Met y Lys. Hubo tend<br>incrementarse la producción de leche compar<br>Producción de proteína mayor en Lys y MetLy<br>mayor en MetLys que Met (p<0.05) y tendió a<br>control y Lys. Beta caseína incrementó en Me<br>caseína no cambió.   |       |
|                                      | Met                |  | 0                        | 11.7      | 21.39           |  |  |  | 14.47 |
|                                      | Lys                |  | 18.2                     | 0         | 20.73           |  |  |  | 14.45 |
|                                      | MetLys             |  | 18.2                     | 11.7      | 21.64           |  |  |  | 14.60 |
| Wang et al<br>(2010)                 | Control            | 60 Holstein<br>Chinas (mitad<br>lactancia)<br>Bloques al<br>azar | 0                        | 0         | 20.9            | Pellets de alfalfa, heno de<br>graminea, ensilaje de maíz              | 8 semanas  | No hubo diferencias en CMS, vacas en el trata<br>MetLys tuvieron mayor contenido de grasa (K<br>y menor concentración de NEFAS que control<br>diferencias significativas en porcentaje de pro<br>o conteo de células somáticas. MetLys tuvo un<br>conversión del N consumido a N en leche y ma<br>concentración de urea en suero, orina y leche<br>control, Met y Lys (p<0.05)   |       |
|                                      | Met                |  | 0                        | 31        | 20.7            |  |  |  | 16.4  |
|                                      | Lys                |  | 105                      | 0         | 21.0            |  |  |  | 16.4  |
|                                      | MetLys             |  | 104                      | 31        | 20.7            |  |  |  | 16.4  |

Tabla 3. Estudios realizados para evaluar el efecto de la suplementación de Met o Lys y Met sobre CMS, producción y composición de la leche en vacas en pastoreo

| Estudio<br>(Fuente<br>Bibliográfica) | Tratamientos                           | No. de<br>animales                                 | Cantidad<br>suplementada                                   |           | Consumo<br>CMSt | Dieta<br>Tipo dieta                                     | PC<br>(%)   | Duración<br>del<br>experimento  | Resultados   |
|--------------------------------------|--|--|--|-----------|-----------------|---|---|---|--|
|                                      |  |  | Lys (g/d)  | Met (g/d) |                 |   |   |   |  |
| Pacheco- Ríos<br>et al (1997)        | Control                                | 26 vacas<br>Holstein<br>(Mitad de la<br>lactancia) | 0  | 0         | 16.7            | Pastura fresca de<br>trébol blanco y raigrás<br>perenne | 18.1  | 14 días   | La Met suplementada tendió ligeramente a disminuir el CMSt y tendió a aumentar la producción de leche (p=0.08) para el grupo con Met-i.v vs control y MetP. Comparado con el grupo control, Met-i.v y MetP redujo la concentración de la grasa en la leche e incrementó la concentración de caseína. Ni la lactosa ni las concentraciones de N del suero de la leche fueron afectadas por los tratamientos. La suplementación con Met no afectó la producción total de la proteína. Producción de proteína y producción de caseínas ajustadas a un consumo de proteína igual, la suplementación con Met mejoró la eficiencia con la que la proteína dietaria es convertida a caseína en vacas consumiendo pasturas |
|                                      | Met- iv<br>(Infusión<br>intra yugular) |  | 0  | 15        | 15.8            |   | 17.2  |   |  |
|                                      | MetP                                   |  | 0  | 15        | 16.2            |   | 17.4  |   |  |
| Rusdi y Van<br>Houtert<br>(1997)     | Control<br>(cebada)                    | 204 vacas  | 0  | 0         | 18.3            | Pastura raigrás con PC<br>promedio de 21.4%             | 10 semanas<br>para cada<br>tercio de<br>lactancia | CMS forraje y total, producción de sólidos totales, peso vivo no presentaron diferencias entre grupos. La composición de la leche y la proteína no fueron afectados por los aminoácidos protegidos o proteína protegida. Más trabajos con mayores niveles de suplementación de proteína o AA son requeridos |  |
|                                      | MetLys<br>(Cebada +<br>MetLys)         |  | 17 (estimado para<br>aportar 6.4 g/d Met y<br>4.0 g/d Lys) |           | 17.9            |   |   |   |  |
|                                      | PPR (harina de<br>soya y pescado)      |  | 0  | 0         | 17.8            |   |   |   |  |

De lo todo expuesto, se evidencia claramente la falta de datos experimentales sobre los efectos de la Met y Lys protegidas en sistemas de pastoreo, razón por la cual, surge la relevancia de evaluar y confirmar en el presente trabajo de Tesis doctoral; si para los sistemas Colombianos de producción lechera la Lys y la Met son nutrientes limitantes para la producción de proteínas lácteas, a fines de corregir esta deficiencia con la suplementación de fuentes de AA protegidas tal como se desarrolló en los capítulos posteriores.

## **Bibliografía**

**Afzalzadeh A, Rafiee H, Khadem A.A, Asadi A.** 2010. Effects of ratios of non-fibre carbohydrates to rumen degradable protein in diets of Holstein cows: 1. Feed intake, digestibility and milk production. South African Journal of Animal Science 40 (3): 204-212

**Annison E, Linzell J.** 1964. The Oxidation and Utilization of Glucose and Acetate by the Mammary Gland of the Goat in Relation to Their over-All Metabolism and Milk Formation. J Physiol 175:372 -385

**Alves D.** 1994. Nutrição aminoácídica de bovinos. Revista brasileira de Agrociência 10(3):265-271.

**Armentano L, Bertics S, Ducharme G.** 1997. Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. Journal Dairy Science 80:1194–1199

**Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez A, Bouza J.** 2001. Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales. Ars Pharmaceutica. 42 (3-4): 135 -145

**Bequette B, Hanigan M, Lapierre H.** 2003. Mammary uptake and metabolism of amino acids by lactating ruminants. Amino acids in animal nutrition. Second Edition. CABI Publishing, Wallingford, UK.

**Berthiaume R, Dubreuil P, Stevenson M, McBride B, Lapierre H.** 2001. Intestinal Disappearance and Mesenteric and Portal Appearance of Amino Acids in Dairy Cows Fed Ruminally Protected Methionine<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 84(1):194-203.

**Broderick G.** 2003. Effects of Varying Dietary Protein and Energy Levels on the Production of Lactating Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 86(4):1370-1381.

**Canale C, Muller L, McCahon H, Whitsel T, Varga G, Lormore M.** 1990. Dietary Fat and Ruminally Protected Amino Acids for High Producing Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 73(1):135-141.

**Caroli A, Chessa S, Erhardt G.** 2009. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition. *Journal of Dairy Science* 92 (11): 5335-52

**Casamiglia S, Stern M, Bach A.** 2000. Enzymatic and microbial-cell preparation techniques for predicting rumen degradation and postruminal availability of protein. *Forage evaluation in ruminant nutrition.* 259-280.

**Chalupa W, Galligan D, Ferguson J.** 1996. Animal nutrition and management in the 21st century: dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology* 58(1-2):1-18.

**Chanat E, Martin P, Ollivier-Bousquet M.** 1999.  $\alpha$ 1-casein is required for the efficient transport of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112:3399–3412

**Clare D, Swaisgood H.** 2000. Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *J Dairy Sci* 83:1187–1195

**Clark JH, Spires HR, Derrig RG, Bennink MR.** 1978. Milk production, nitrogen utilization and glucose synthesis in lactating cows infused postruminally with sodium caseinate and glucose. *J Nutr* 107(4):631-644.



**Colin-Schoellen O, Laurent F, Vignon B, Robert J, Sloan B.** 1995. Interactions of ruminally protected methionine and lysine with protein source or energy level in the diets of cows. *Journal of dairy science* 78(12):2807-2818.

**Conpes.** 2010. Política Nacional para mejorar la competitividad del sector lácteo colombiano. Online. Available: <http://es.scribd.com/doc/48295364/Conpes-Sector-Lacteos-2010>

**Correa H.** 2006. Posibles factores nutricionales, alimenticios y metabólicos que limitan el uso del nitrógeno en la síntesis de proteínas lácteas en hatos lecheros de Antioquia. *Livestock Research for Rural Development* 18 (3).

**Davis T, Nguyen H, Garcia-Bravo R, Fiorotto M, Jacksonz E, Reeds P.** 1994. Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. *British Journal of Nutrition.* 72: 845-853

**Dennison C, Phillips A.** 1983. Estimation of the duodenal amino acid supply in ruminants by amino acid analysis of the products of fermentation in vitro. *South African Journal Animal Science.* 13(2): 120 – 126.

**Dinn N, Shelford J, Fisher L.** 1998. Use of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System and Rumen-Protected Lysine and Methionine to Reduce Nitrogen Excretion from Lactating Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 81(1):229-237.

**Enroth C, Eger B, Okamoto K, Nishino T, Nishino T, Pai E.** 2000. Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure based mechanism of conversion. *PNAS.* 97 (20) , 10725

**Farrell H, Jimenez-Flores R, Bleck G, Brown E, Butler J, Creamer L, Hicks C, Hollar C, Ng-Kwai-Hang K, Swaisgood H.** 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk--sixth revision. *Journal of Dairy Sciences* 87(6):1641-74.

**Greenwood R, Titgemeyer E.** 2000. Limiting amino acids for growing Holstein steers limit-fed soybean hull-based diets. *Journal Animal Science.* 78:1997–2004.

**Guillaume B, Otterby D, Stern M, Linn J.** 1991. Raw or extruded soybeans and rumen-protected methionine and lysine in alfalfa-based diets for dairy cows. *Journal of Dairy Science* 74:1912–1922

**Hanigan M.** 2005. Quantitative aspects of ruminant splanchnic metabolism as related to predicting animal performance. *Animal Science*. 80: 23-32

**Hernández-Ledesma B, Recio I, Amigo L.** 2008. Beta-lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids*. 35(2):257-65.

**Horwitz W.** 2000. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC international Gaithersburg, MD.

**INRA.** 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Ed. R. Jarrige, INRA, Paris, 471 p.

**Kamalak A, Canbolat Ö, Gurbuz Y, Özay O.** 2005. Protected Protein and Amino Acids in Ruminant Nutrition. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 8(2):2005.

**Kim C, Choung J, Chamberlain D.** 1999. Determination of the first limiting amino acid for milk production in dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal based supplement containing feather meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(12):1703-1708.

**Kim H, Jimenez-Flores R.** 1994. Comparison of milk proteins using preparative isoelectric focusing followed by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of dairy science* 77(8):2177-2190.

**Kimball S, Jefferson L.** 2005. Role of amino acids in the translational control of protein synthesis in mammals. *Semin Cell Dev Biol* 16(1):21-27

**Klopfenstein T.** 1996. Need for escape protein by grazing cattle. *Animal Feed Science and Technology* 60(3-4):191-199.

**Kontopidis G, Holt C, Sawyer L.** 2004. Invited Review:  $\beta$ -Lactoglobulin: Binding Properties, Structure, and Function. *J. Dairy Sci.* 87 (4):

**Kung L.** 1996. Amino acid metabolism in ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 59(1-3):167-172.

**Kumosinski T, Brown E, Farrell H.** 2010 Three-dimensional molecular modeling of bovine caseins: alpha s1-casein. *J Dairy Sci.* 1991 Sep;74(9):2889-95

**Mather I.** 2000. A Review and Proposed Nomenclature for Major Proteins of the Milk-Fat Globule Membrane. *J Dairy Sci* 83:203–247

**Laemmli U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.

**Lapierre H, Pacheco D, Berthiaume D, Ouellet C, Schwab P, Dubreuil G, Holtrop G, Lobley G.** 2006. What is the True Supply of Amino Acids for a Dairy Cow?. *Journal of dairy science* 89 (Suppl 1): E1-E14.

**Liu C, Schingoethe D, Stegeman G.** 2000. Corn distillers grains versus a blend of protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows. *Journal Dairy Science* 83:2075–2084

**Madsen T, Nielsen L, Nielsen M.** 2005. Mammary nutrient uptake in response to dietary supplementation of rumen protected lysine and methionine in late and early lactating dairy goats. *Small Ruminant Research* 56 (1-3):151-164

**Manterola H.** 2002. Manejo nutricional y composición de la leche. El desafío de incrementar los sólidos totales en la leche. Una necesidad a corto plazo. . Circular de Extensión Técnico Ganadera. 28. Online. Available: [http://www.agronomia.uchile.cl/extension/circular\\_extensio\\_panimal/CIRCULAR%20DE%20EXTENSION/N\\_33/capitulo\\_1.pdf](http://www.agronomia.uchile.cl/extension/circular_extensio_panimal/CIRCULAR%20DE%20EXTENSION/N_33/capitulo_1.pdf).

**Mephram T.** 1982. Amino acid utilization by lactating mammary gland. *J Dairy Sci* 65(2):287-298.

**Moshel Y, Rhoads E, Barash I.** 2006. Role of amino acids in translational mechanisms governing milk protein synthesis in murine and ruminant mammary epithelial cells. *J Cell Biochem* 98(3):685-700.

**Nichols J, Schingoethe D, Maiga H, Brouk M, Piepenbrink M.** 1998. Evaluation of Corn Distillers Grains and Ruminally Protected Lysine and Methionine for Lactating Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 81(2):482-491.

**Oliveira A, Valadares R, Valadares S, Cecon P, Rennó L, Queiroz M, Chizzotti A.** 2001. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(5):1621-1629.

**Pacheco-Rios D, McNabb W, Hill J, Barry T, Mackenzie D.** 1997. The effects of methionine supply upon milk composition and production of dairy cows in mid-lactation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 57: 147 - 150.

**Palmquist D, Beaulieu D, Barbano D.** 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 76(6):1753-1771.

**Pásztor-Huszár K.** 2008. Protein changes of various types of milk as affected by high hydrostatic pressure processing. PhD Thesis. Corvinus University of Budapest. Department of Refrigeration and Livestock Products Technology

**Patton R.** 2010. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *Journal of dairy science* 93(5):2105-2118.

**Polan C, Cummins K, Sniffen C, Muscato T, Vicini J, Crooker B, Clark J, Johnson D, Otterby D, Guillaume B.** 1991. Responses of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. *Journal of dairy science* 74(9):2997-3013.

**Polji ak-Milas N, Marenjak T.** 2007. Dietary supplement of the rumen protected methionine and milk yield in dairy goats. *Arch. Tierz., Dummerstorf.* 50(3):273-278.

**Robinson P.** 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* 127(2-3):115-126.

**Robinson P, Chalupa W, Sniffen C, Julien W, Sato H, Fujieda T, Ueda T, Suzuki H.** 2000. Influence of abomasal infusion of high levels of lysine or methionine, or both, on ruminal fermentation, eating behavior, and performance of lactating dairy cows. *Journal Animal Science* 78:1067–1077

**Robinson P, Fredeen A, Chalupa W, Julien W, Sato H, Fujieda T, Suzuki H.** 1995. Ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows fed a diet designed to meet requirements for microbial and post-ruminal protein. *Journal of dairy science* 78(3):582-594.

**Rogers J, Peirce-Sandner S, Papas A, Polan C, Sniffen C, Muscato T, Staples C, Clark J.** 1989. Production responses of dairy cows fed various amounts of rumen-protected methionine and lysine. *Journal of dairy science* 72(7):1800-1817.

**Roncada P, Piras C, Soggiu A, Turk R, Urbani A, Bonizzi L.** 2012. Farm animal milk proteomics. Review. *J Prot.* doi:10.1016/j.jprot.2012.05.028

**Roseler D, Ferguson J, Sniffen C, Herrema J.** 1993. Dietary protein degradability effects on plasma and milk urea nitrogen and milk nonprotein nitrogen in Holstein cows. *Journal of dairy science* 76(2):525-534.

**Rusdi, Van Houtert M.** Responses to protected amino acids or protected protein in dairy cows grazing ryegrass pastures in early or late lactation. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production.* 57: 120-125.

**Sélo I, Clément G, Bernard H, Chatel J, Créminon C, Peltre G, Wal J.** 1999. Allergy to bovine beta-lactoglobulin: specificity of human IgE to tryptic peptides. *Clin Exp Allergy.* 29 (8):1055-63.

**Schingoethe DJ.** 1996. Balancing the amino acid needs of the dairy cow. *Animal Feed Science and Technology* 60(3-4):153-160.

**Schwab C.** 1996. Rumen-protected amino acids for dairy cattle: progress towards determining lysine and methionine requirements. *Animal Feed Science and Technology* 59(1-3):87-101.

**Sevi A, Rotunno T, Di Caterina R, Muscio A.** 1998. Rumen-protected methionine or lysine supplementation of Comisana ewes' diets: effects on milk fatty acid composition. *Journal of dairy research* 65(03):413-422.

**Socha M, Putnam D, Garthwaite B, Whitehouse N, Kierstead N, Schwab C, Ducharme G, Robert. J.** 2005. Improving Intestinal Amino Acid Supply of Pre-and Postpartum Dairy Cows with Rumen-Protected Methionine and Lysine\*,+. *Journal of dairy science* 88(3):1113-1126.

**Storm E, Ørskov E.** 1984. The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 4. The limiting amino acids of microbial protein in growing sheep determined by a new approach. *British Journal Nutrition.* 52:613–620.

**Swaisgood H.** 1993. Symposiun: Genetic perspectives on milk proteins. Comparative studies and nomenclature. Review and Update of Casein Chemistry. *J Dairy Sci* 76:3054-3061

**Threadgill D, Womack J.** 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research.* 18(23): 6935–6942.

**Toerien C, Cant J.** 2007. Abundance and phosphorylation state of translation initiation factors in mammary glands of lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* 90(6):2726-2734.

**Torre C, Caja G.** 2004. Utilización de aditivo en rumiantes: Vitaminas y aminoácidos protegidos XIV Curso de Especializacion Avances en nutricion y Alimentacion Animal.

**Třináctý J, Křížová L, Richter M, Černý V, Říha J.** 2009. Effect of rumen-protected methionine, lysine or both on milk production and plasma amino acids of high-yielding dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.,* 54 (6): 239–248

**Uniacke-Lowe T.** 2011. Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk. PhD Thesis, University College Cork.

**Wang C, Liu H, Wang Y, Yang Z, Liu J, Wu Y, Yan T, Ye H.** 2010. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93 :3661–3670

**Welper R, Freeman A.** 1992. Genetic Parameters for Yield Traits of Holsteins, Including Lactose and Somatic Cell Score<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 75(5):1342-1348.

**Wu Z, Fisher R, Polan C, Schwab C.** 1997. Lactational Performance of Cows Fed Low or High Ruminally Undegradable Protein Prepartum and Supplemental Methionine and Lysine Postpartum<sup>1</sup>. *Journal of dairy science* 80(4):722-729.

**Weekes T, Luimes P, Cant J.** 2006. Responses to amino acid imbalances and deficiencies in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 89(6):2177-2187.

**Zucht H.** 1995 "Casocidin-I: a casein- $\alpha$ S2 derives peptide exhibits antibacterial activity". 372, 185-188 *FEBS Letters*, pp. 185-188.

### **CAPÍTULO 3. DIGESTIÓN DE LA MATERIA SECA, PROTEÍNA CRUDA Y AMINOÁCIDOS DE LA DIETA DE VACAS LECHERAS**

Este capítulo fue desarrollado para satisfacer el primer objetivo específico de la tesis que es determinar el efecto de la suplementación con AA protegidos sobre la cantidad de proteína metabolizable en vacas lecheras.

La proteína metabolizable procede de 3 fuentes a saber: la proteína no degradable en rumen (PNDR), la proteína microbiana (PMicrob) y la proteína endógena (PE). La proteína que se quiso cuantificar en este capítulo es la PNDR, definida como la proteína de origen dietario sin degradar que llega al intestino delgado para ser absorbida. El origen de esta proteína reconoce como fuente al forraje fresco (pasto kikuyo), al alimento concentrado y a las fuentes de AA protegidos (lisina (Lys) y metionina (Met)) que suplirán la deficiencia generada por la dieta.

El contenido del presente capítulo fue presentado como artículo a la Revista Agronomica Mesoamericana y se encuentra en proceso de evaluación y publicación.



### **CAPÍTULO 3. DIGESTIÓN DE LA MATERIA SECA, PROTEÍNA CRUDA Y AMINOÁCIDOS DE LA DIETA DE VACAS LECHERAS<sup>1</sup>**

Mónica Duque Quintero<sup>2,3</sup>, Ricardo Rosero Noguera<sup>2</sup>, Marta Olivera Ángel<sup>3</sup>

#### **RESUMEN**

El objetivo de este trabajo fue determinar la tasa de pasaje ruminal de la fracción sólida (Kp), la degradabilidad ruminal (DR) y la digestibilidad intestinal (DI) de la MS, PC y AA del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), de un suplemento comercial y de metionina (MetP) y lisina (LisP) protegidas. Entre los meses de febrero y marzo del 2013 en San Pedro de los Milagros (Antioquia, Colombia), fueron utilizadas dos vacas canuladas para realizar la determinación de la Kp usando como marcador la FDN mordantada con cromo, la DR in situ y la DI mediante sonda abomasal. Describir como estaba compuesta la ración de base. Los datos para calcular la Kp fueron analizados por regresión no lineal usando el procedimiento NLIN de SAS y mediante estadística descriptiva para la desaparición de la MS, PC y AA. Se calculó una Kp y un tiempo medio de retención ruminal de 3.65%/hora y 27.4 horas, respectivamente. Las mayores DR de la MS y PC fueron para el kikuyo (69.0 y 61.8%) y concentrado (84.7 y 77.2), seguido de la MetP (60.2 y 66.7%) y LysP (6.72 y 11.4%). De forma similar, los mayores promedios en el porcentaje de AADR fueron para el kikuyo y el concentrado, variando entre 58.7 y 68% para el forraje, y 76.1 y 82.9% para el concentrado. Por otra parte, se encontró que la DR de LysP fue de 11.5% mientras que para MetP fue del 65.8% (% del AAI). Las DI de todos los AA como porcentaje del AANDR variaron entre 42.3 y 77.4% para el kikuyo y 42.2 y 59.3% para el concentrado, mientras que los valores para los aminoácidos protegidos fueron de 42.1 para LysP y 58.6 para MetP.

---

<sup>1</sup> Parte de la tesis doctoral “Efecto de la suplementación con metionina y lisina protegidas sobre el flujo de aminoácidos, producción de leche y concentración de proteínas lácteas”. Doctorado en Ciencias Animales de la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA. Carrera 75 # 65-87, AA 1226, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup> Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación Biogénesis. Carrera 75 # 65-87, AA 1226, Medellín, Colombia. Correspondencia de los autores: monicadu82@gmail.com, ricnoguera@gmail.com, martha.olivera@udea.edu.co.

**Palabras claves:** Degradabilidad ruminal, digestibilidad intestinal, metionina protegida, lisina protegida, tasa de pasaje.

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to determine the ruminal passage rate (Kp), ruminal degradability (RD) and intestinal digestibility (ID) of DM, CP and AA from Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*), a commercial supplement and two sources of rumen-protected AA. Between February and March of 2013 in San Pedro de los Milagros (Antioquia, Colombia), were used two cows cannulated for the determination of Kp, RD and ID by abomasal catheter. The data to calculate Kp were analyzed by nonlinear regression using the NLIN procedure by SAS and descriptive statistics for the disappearance of DM, CP and AA. Was found a Kp of 3.65%/h and an average ruminal retention time of 27.4 h. The highest RD of MS and CP were from Kikuyu grass (69.0 and 61.8%) and concentrated (84.7 and 77.2%), followed by MetP (60.2 and 66.7%) and lysP (6.72 and 11.4%). Similarly, the highest percentages of AADR were from Kikuyu and concentrated, varying between 58.7 and 68% in Kikuyu, and 76.1 and 82.9% in the concentrate. Moreover, it was found that the RD was 11.5% in LysP while that in MetP was of 65.8%. The ID AA as a percentage of RUAA varied between 42.3 and 77.4% for Kikuyu and 42.2 and 59.3% for concentrate. The values for the protected amino acids were 42.1 and 58.6 for lysP and MetP respectively.

**Keywords:** Ruminal degradability, intestinal digestibility, rumen-protected methionine, rumen-protected lysine, passage rate.

## **INTRODUCCIÓN**

Los actuales sistemas de alimentación proteica para el ganado de leche están basados en las proteínas digestibles en el intestino delgado (ID) y más importante aún en la cantidad de aminoácidos (AA) digestibles. Los AA que llegan al ID provienen de tres fuentes: Los aportes desde la proteína no degradada en el rumen (PNDR), proteína microbiana (PMicrob) y proteína endógena (PE).

La PNDR es la proteína que escapa de la degradación ruminal y pasa al abomaso e intestino para su su digestión y absorción. La PMicrob, es sintetizada en el rumen a partir de la utilización de AA, péptidos y el amoníaco producido por la degradación de la proteína degradable en rumen (PDR) e hidratos de carbono estructurales y los fácilmente disponibles como fuente energética. La PMicrob está constituida por células de bacterias, hongos y protozoarios y en condiciones de correcta alimentación suministra más del 60% de la proteína total que alcanza el intestino delgado (NRC, 2001). Por lo tanto, la clave para la utilización eficiente del alimento es formular raciones para optimizar la síntesis de PMicrob y el suministro de PNDR que lleguen al ID y aporten un perfil de AA adecuado para cubrir los requerimientos de los animales.

En los últimos años, productores, investigadores y nutricionistas se han interesado en incrementar los niveles de proteína láctea en vacas lecheras porque este es un factor importante para la elaboración de quesos e influye en el sistema de pago de la leche. Algunos estudios que se han llevado a cabo con la finalidad de incrementar las respuestas productivas del ganado lechero no encuentran efectos en la adición de mayor cantidad de proteína dietaria, lo que puede ser explicado por un exceso de proteína cruda (PC) en la dieta, un balance energético negativo o un posible desbalance de AA (Chiou et al., 1995; Van Straalen et al., 1997). Se ha informado que ciertos AA como lisina (Lys), metionina (Met) y leucina (Leu) constituyen el primer, segundo y tercer AA más limitante o co-limitantes para la síntesis de proteína láctea (Schwab et al., 1992; Rulquin y Delaby, 1997). Si el perfil de AA que llega al ID no tiene suficiente cantidad disponible de estos AA, la producción y síntesis de proteína en la glándula mamaria se verá limitada. En sus recomendaciones, el NRC (2001) establece que la relación Lys:Met debe ser 3:1 en la proteína metabolizable (PM) para que los requerimientos de estos dos aminoácidos sean cubiertos principalmente en dietas basadas en ensilaje de maíz, subproductos de maíz, proteínas de origen animal y leguminosas forrajeras. Sin embargo, Patton *et al.* (2006) se señala que los requerimientos de los aminoácidos se deben plantear de manera individual y no como una relación, por lo que se deben definir los requerimientos y aportes de cada uno de los aminoácidos para

establecer su balance. En los últimos años, la industria de alimentos para rumiantes ha desarrollado productos comerciales de AA protegidos con el fin de cubrir las deficiencias de Met y Lys de la dieta ofrecida a los animales (Robinson, 1996; Robinson, 2009).

En algunos casos, la suplementación con estos dos AA ha tenido efectos positivos en la producción, composición de la leche (Piepenbrink et al., 2004; Socha et al., 2005; Cabrita et al., 2011) y reducción del nitrógeno ureico en leche (MUN) (Bach et al., 2000). Sin embargo, los resultados no son contundentes ya que en otros estudios no se reportan estos efectos (Misciattelli et al., 2003; Davidson et al., 2008; Benefield et al 2009; Swanepoel et al 2010).

Productos comerciales como el Mepron® y AjiPro-L®, que aportan Met y Lys protegidas han sido desarrollados por compañías como Evonik (Evonik Industries AG, Hanau, Alemania) y Ajinomoto (Heartland, Inc, Japón), a fines de aportar una alta cantidad del AA al ID y de esta manera compensar las deficiencias que las raciones puedan generar. AjiPro-L es una matriz de L-Lisina-HCl y aceite vegetal que resistente a la acción física y microbiana en rumen mientras que el Mepron es Met cubierta por una delgada capa de etilcelulosa (Kudrna et al., 2009).

Una causa que explicaría la falta de respuesta a la suplementación con AA es la escasez de información precisa acerca del metabolismo de la proteína y de los AA en el organismo de los rumiantes en lo que respecta a su degradación ruminal y capacidad sobrepasante.

Los sistemas de producción especializada de leche en Colombia carecen de información relacionada con la cantidad de proteína metabolizable (PM), AA metabolizables, perfil de AA de la dieta que llega al ID y la relación Lys:Met de la PM. Esta información resulta necesaria para el mejoramiento en la formulación adecuada de las raciones.

Por lo expuesto, resulta de importancia conocer la cantidad de PM que llega al ID del animal desde sus tres fuentes principales: PNDR, PMicrob y PE. Conocer la cantidad de PNDR y AANDR tanto del pasto kikuyo como del suplemento

concentrado utilizado que resisten la degradación ruminal y son absorbidos en el ID constituye un primer paso para estimar con mayor precisión los balances de proteína y AA en vacas lecheras. Lo anterior, explica la necesidad obtener valores de degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de la MS, PC y AA para conocer los aportes que los diferentes alimentos hacen para un correcto balance aminoacídico en el animal.

Para la determinación de estos valores resulta necesario cuantificar la tasa de pasaje (kp) de la fracción sólida del alimento variable que influye sobre la composición de la población microbiana, la eficiencia de fermentación ruminal, la regulación del consumo y la cantidad de proteína y AA que llega al ID sin ser degradada en el rumen (Bartocci et al., 1997). El mayor o menor tiempo de retención (inversa de la Kp) en el retículo-rumen afecta los procesos de digestión y de asimilación de los nutrientes en el animal, aumentando o disminuyendo los aportes de PM o AA hacia el ID.

El objetivo de este trabajo fue determinar la tasa de pasaje de la fracción sólida, la degradabilidad ruminal y la digestibilidad intestinal de la MS, PC y AA del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), de un suplemento comercial de uso frecuente en ganado de tambo y dos fuentes de AA protegidos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Localización.** El trabajo fue realizado en la hacienda “La Montaña” propiedad de la Universidad de Antioquia. Ésta se encuentra ubicada a 2350 m.s.n.m., con una temperatura promedio de 15°C y una humedad relativa promedio de 72% en una formación ecológica de bh-MB (IDEAM, 1997).

**Animales.** Se utilizaron 2 vacas secas canuladas de la raza Holstein para determinar la tasa de pasaje de la fracción sólida, degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de la MS, PC y AA del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), del suplemento comercial y de los AA protegidos. El trabajo fue realizado entre los meses de febrero y marzo del 2013. Es necesario indicar que

sólo se contaba con 2 animales y por esta razón sólo se describen valores promedios de cada parámetro para cada alimento.

**Manejo y Alimentación.** Los animales fueron manejados en un sistema de pastoreo rotacional en franjas con pasto kikuyo, con períodos de ocupación de 5 días y fueron suplementados con 2 Kg de un alimento comercial durante 14 días previos al inicio del experimento y durante la totalidad del periodo experimental, el cuál consistió de 19 días de duración. En el potrero los animales contaron con libre acceso a agua fresca y sal mineral.

**Tasa de pasaje.** Este parámetro fue estimado previo a la prueba de degradabilidad ruminal utilizando el método de la fibra mordantada con cromo (Cr). Para tal fin, la fibra en detergente neutro (FDN) del pasto kikuyo, con 60 días de rebrote fue tratada con dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7 \cdot 2H_2O$ ), como marcador de la fase sólida de la digesta (72 g de  $K_2Cr_2O_7$ /kg MS) según lo descrito por Uden et al. (1980). El dicromato fue disuelto en 500 mL de agua caliente a 100°C y adicionado a la muestra de FDN del pasto kikuyo previamente molido en una criba de 4 mm en un molino Thomas Model 4 Wiley® Mill (Modelo 4, Arthur H., Thomas Co., Philadelphia, PA). La mezcla de dicromato de potasio y la FDN del kikuyo fue llevada a la estufa de aire forzado durante 24 horas. Posteriormente, el material fue lavado con agua corriente durante 1 hora y dejado toda la noche en una solución de ácido ascórbico con un pH < 4.5 con la finalidad de eliminar completamente el Cr que no se hubiera adherido a la FDN. Al siguiente día el material fue lavado por última vez durante 1 hora y secado durante 12 h a 100°C para finalmente ser utilizado (Ramanzin et al., 1991).

La fibra mordantada fue suministrada a cada animal (75 g) según Campos et al., (2007) con 4.43% de Cr en una única dosis vía fistula ruminal (Pereira et al., 2005). Aproximadamente, 150 g de heces fueron colectadas directamente del recto de los animales a las 0, 8, 12, 16, 20, 24, 32, 36, 48, 60 y 84 h después de colocada la fibra mordantada en el rumen. La concentración de Cr en la fibra mordantada y en las heces fueron determinadas por espectrometría de absorción atómica (Holden et al., 1994).

La estimativa de la tasa de pasaje (k) en el rumen fue obtenida mediante el modelo la metodología propuesta por Galyean (1997):

$Y = A e^{(-k*t)}$ , donde:

Y= Concentración del marcador (mg/kg)

t= Tiempo de muestreo pos-dosificación

A =Parámetro de escala

k= Tasa de pasaje ruminal ( $h^{-1}$ )

e = Función exponencial (base de logaritmo natural = 2,7183) (Kendall et al., 2009)

El tiempo medio de retención en el rumen (TMRR) fue calculado desde el parámetro Kp usando la ecuación  $TMRR = 1/Kp$  (Pereira et al., 2005)

**Alimentos evaluados.** Los alimentos utilizados para evaluar las fracciones proteicas como proteína degradable en rumen (PDR) y proteína no degradable en rumen (PNDR), fueron los componentes de una dieta completa para vacas lecheras de alta producción que normalmente incluyen al pasto kikuyo y al suplemento comercial). Adicionalmente, fueron incluidas en la ración dos fuentes de AA protegidos: MetP (Mepron: Metionina protegida) y LysP (AjiProL: Lisina protegida) y capacho de maíz para descontar la contaminación microbiana (Cuadro 1). Los aminoácidos protegidos usados en este experimento, fueron los productos comerciales denominados AjiPro<sup>TM</sup>-L (Lys protegida manufacturado por la compañía Ajinomoto (Tokyo, Japón), el cual es una matriz compuesta de mínimo 50% de Lys (L-lisina monohidrócloruro HCl), 49% de ácidos grasos protegidos ruminalmente sensibles al pH intestinal y 1% de lecitina de soya (<http://www.ajipro-l.info/>) y la Met protegida (Mepron®) manufacturada por la Industria Evonik (Degussa AG, Alemania) conteniendo 85% de metionina, 3% de fibra cruda, 1% de extracto etéreo y 1.5% cenizas (<http://feed-additives.evonik.com>).

Los alimentos fueron analizados para determinar su composición química según los métodos descritos en el AOAC (2002) en el laboratorio NUTRILAB y de Nutrición Animal pertenecientes a la Universidad de Antioquia, ubicados en la Sede de Investigación Universitaria y la Facultad de Ciencias Agrarias, respectivamente. Las concentraciones de MS total, PC y cenizas fueron determinadas de acuerdo a los métodos 934.01, 976.05 y 923.03 de AOAC, (2002) y el contenido de extracto etéreo (EE) de acuerdo a la AOAC (1995). La FDN, fibra en detergente ácida (FDA) y lignina en detergente ácido (LDA) obtenidos por la metodología descrita por Van Soest et al (1991) y AOAC, método 973.18 procedimiento C y D (1990). En el residuo de la FDA se determinó el contenido de PC para determinar la PC insoluble en el detergente ácido (PCIDA) (Ver cuadro 1).

El contenido de Met en la MetP y de Lys en la LysP fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Nollet, 2000) mientras que el contenido del total de nutrientes digestibles (TDN) del forraje y el alimento concentrado fue estimado utilizando el procedimiento propuesto por Weiss et al (1992), que parte de calcular las digestibilidades verdaderas de los CNE (dvCNE), de la PC (dvPC), del FDN (dvFDN) y del EE (dvEE), basado en la composición química de los alimentos. Para el concentrado fue usada la siguiente ecuación con el fin de corregir el contenido de TDN para este alimento. El forraje por tener un TDN menor o igual a 60.0% no requirió de este ajuste.

$$\text{Descuento de TDN (Mcal/Kg)} = \frac{\left( \text{TDN1X} - \left( (0.18 * \text{TDN1X}) - 0.13 \right) \right) * \text{Consumo}}{\text{TDN1X}}$$

Tabla 1. Composición nutricional de los alimentos evaluados. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2014

Table 1. Chemical composition of feeds evaluated. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013



|                        | Kikuyo            | Concentrado       | MetP              | LysP              |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| MS total, %            | 10.9              | 90.2              | 98.2              | 97.4              |
| PC, % MS               | 18,2              | 17,1              | 43,9              | 56.3              |
| TDN, % MS              | 60.4 <sup>3</sup> | 76.0 <sup>3</sup> |                   |                   |
| EE, % MS               | 3,12              | 3,9               | 1.00 <sup>1</sup> | 42.7              |
| FDN, % MS              | 56,4              | 21,8              | 3                 |                   |
| FDA, % MS              | 31.4              | 16.5              |                   |                   |
| LDA, % MS              | 6,35              | 3,83              |                   |                   |
| PCIDA                  | 1,8               | 1,1               |                   |                   |
| CNE, % MS              | 11,4              | 47,2              |                   |                   |
| ENL (Mcal/Kg de MS)    | 1.36              | 1.77              | 1.94 <sup>1</sup> | 3.26 <sup>2</sup> |
| Cenizas, % MS          | 10,9              | 10                | 1.50 <sup>1</sup> |                   |
| Ca, % MS               | 0.34              |                   |                   |                   |
| P, % MS                | 0.31              |                   |                   |                   |
| Lecitina de Soya, % MS |                   |                   |                   | 1.00 <sup>2</sup> |
| Met, % MS              | 0.31              | 0.58              | 45.3              |                   |
| Lys, % de MS           | 0.95              | 1.09              |                   | 37.7              |

<sup>1,2</sup> Valores de referencia reportados por la casa comercial, <sup>3</sup>Estimado utilizando el modelo sumativo desarrollado por Weiss et al. (1992), MetP: Metionina protegida ruminalmente (Mepron), LysP: Lisina protegida ruminalmente (AjiPro-L), MS: Materia seca, PC: Proteína cruda, TDN: Total de nutrientes digestibles, EE: extracto etéreo, FDN: Fibra en detergente neutro, FDA: Fibra en detergente ácido, LDA: Lignina en detergente ácido, CNE: Carbohidratos no estructurales = 100 – (%FDN + % PC + % EE + % Cenizas), <sup>5</sup>ENL: Energía neta de lactancia (mcal/kg) = 0.0245 \*NDT (%) – 0.12, Met: Metionina, Lys: Lisina

### **Degradación *in situ* de la MS, PC y AA para las fuentes.**

Para calcular la degradabilidad ruminal fue considerada una tasa de pasaje de la fracción sólida determinada previamente (0.0365h<sup>-1</sup>). Diez y seis muestras de cada alimento (forraje (molido a 2 mm), concentrado, metionina y lisina protegidas, con pesos de 4 g) fueron colocadas en bolsas de polyester (15 cm largo x 7.5 cm ancho y un tamaño de poro de 50 µm). Debido a que la contaminación microbiana podía ser importante, fueron suspendidas también en el rumen bolsas con capacho de maíz (molido a 2 mm) para descontar por diferencia las bacterias que pudieron adherirse a las bolsas (Gargallo et al 2006). Todas las bolsas fueron introducidas en el rumen de cada vaca (8 bolsas/alimento/vaca), por un período de 27.4 h (tiempo estimado de retención ruminal). Concluído este tiempo de permanencia en rumen, las bolsas fueron lavadas con agua corriente y secadas en una estufa de aire forzado a 65 °C por 48 horas. Los residuos de las bolsas fueron posteriormente pesados para obtener la degradabilidad de la MS por

diferencia. Un pool del residuo ruminal de cada una de las fuentes fue confeccionado para determinar la concentración de PC (AOAC, 2002), el perfil de AA mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Nollet, 2000) y para ser usado posteriormente en la determinación de la digestión posruminal. La MS, PC y AA desaparecidos en el rumen fueron calculados como la proporción entre la cantidad de muestra post incubación y la pre incubada. Este valor fue expresado como porcentaje de MS, PC, PNDR, AA iniciales incubados y AANDR.

### **Digestibilidad posruminal de la proteína no degradable en rumen (PNDR).**

Las muestras de forraje, concentrado, capacho de maíz y AA protegidos previamente incubados en rumen durante 27.4 horas fueron sometidos a digestión intestinal utilizando el método *in vivo* descrito por Correa et al. (2010). En este método, 1.0 g del residuo resultante de la incubación ruminal es colocado en bolsas de nylon (2.0 x 1.5 cm) con un tamaño de poro de 11 µm. Cincuenta bolsas móviles de nylon (BMN) por alimento, selladas al calor fueron colocadas en el abomaso de 2 vacas Holstein con cánula ruminal permanente mediante una sonda de polietileno (diámetro externo de 20 mm y una longitud de 1.6 metros (Correa et al., 2010). Las BMN son recuperadas en las heces, las cuales se colectan tres veces al día durante las siguientes 120 horas pos-incubación. Para evitar la pérdida de las BMN, los animales experimentales se mantuvieron en un potrero pequeño, con el fin de no alterar el consumo de forraje, permitiéndolo acompañar la excreción fecal con la recuperación de las BMN (García et al., 2009). Posterior a la recuperación de las BMN en las heces, éstas fueron lavadas con agua corriente, secadas a 60°C por 48 horas y mezcladas para obtener una muestra final por cada alimento (forraje, concentrado y AA protegidos). Sobre los residuos de las BMN se determinaron los contenidos de MS total, PC (AOAC, 2002) y perfil de AA por HPLC. El aminograma para el concentrado no fue determinado debido a que la cantidad de muestra final obtenida fue muy baja y por tanto, fue asumido el mismo perfil del residuo ruminal, lo que podría ocasionar una fuente de error en la determinación, aunque también se puede destacar que la cantidad no degradable

en rumen de la MS, PC y AA es muy baja, ya que casi todo el material es degradado allí y por lo tanto, el error podría ser considerado como mínimo.

La digestibilidad posruminal de PNDR fue calculada por la diferencia entre la cantidad de PC en el remanente después de la incubación ruminal y la cantidad de PC en las BMN colectadas en heces, los valores fueron expresados como un porcentaje de la proteína cruda total y de la PNDR. La digestibilidad total (DT) de la PC se obtuvo mediante la suma de la cantidad de proteína degradada en rumen y la PNDR digerida en el intestino del animal. De la misma manera, se calculó la digestibilidad total de los AA. Debido a que los valores de degradación y absorción de la PC en el capacho de maíz fueron mayores de lo esperado, fue imposible utilizar estos valores para descontar la contaminación microbiana.

### **Análisis estadístico.**

Los datos de tasa de pasaje, desaparición de la MS, PC y AA fueron analizados mediante estadística descriptiva. Se establecieron promedios y desviaciones estándar para cada uno de los alimentos utilizados.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos permiten una caracterización completa de la ración de vacas lecheras en el trópico alto. Este es el primer trabajo en Colombia que describe no solamente la degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de la MS y PC sino también la de los AA. Esta información es importante para determinar que AA pueden estar limitando la producción de proteína láctea en sistemas especializados de producción de leche en el país.

### **Tasa de pasaje**

En este trabajo se encontró una tasa de pasaje para la fracción sólida de la dieta de  $0.0365h^{-1}$  (con  $A = 1.319$ ,  $R^2 = 0.98$ ,  $p < 0.0002$ ), la cual estaba constituida por pasto kikuyo y suplemento comercial. La tasa de pasaje es un parámetro esencial para calcular la degradabilidad efectiva de la MS, la PC y los AA a nivel ruminal y

por diferencia la proporción que llega al intestino delgado de cada una de estas fracciones.

### Degradabilidad Ruminal y digestibilidad posruminal de la MS y PC

La degradabilidad ruminal *in situ* y la digestibilidad intestinal y total de la MS de las diferentes fuentes son presentadas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Degradabilidad ruminal, digestibilidad posruminal y total de los diferentes alimentos. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013

Table 2. Ruminal degradability, post-ruminal digestibility and total-tract digestibility of different feeds. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013

| Parámetro <sup>1</sup> | Kikuyo |      | Concentrado |      | LysP  |      | MetP  |      |
|------------------------|--------|------|-------------|------|-------|------|-------|------|
|                        | Prom.  | EEM  | Prom.       | EEM  | Prom. | EE   | Prom. | EE   |
| DRMS, % MS             | 69.0   | 0.46 | 84.7        | 0.23 | 6.73  | 0.37 | 60.2  | 1.64 |
| MSNDR, % MS            | 31.0   | 0.46 | 15.3        | 0.23 | 93.3  | 0.37 | 39.8  | 1.64 |
| MSNDRDI, % MS          | 14.0   | 0.21 | 7.06        | 0.11 | 29.0  | 0.12 | 25.0  | 1.03 |
| MSInd, % MS            | 17.0   | 0.25 | 8.24        | 0.12 | 64.3  | 0.26 | 14.8  | 0.61 |
| DIMS, % MSNDR          | 45.3   | 1.65 | 46.2        | 0.49 | 31.1  | 0.89 | 62.9  | 2.11 |
| DMS aparente, % MS     | 83.0   | 0.25 | 91.8        | 0.12 | 35.7  | 0.26 | 85.2  | 0.61 |

<sup>1</sup> En la Cuadro son presentadas la media y los EEM, Prom: Promedios, EEM: Error estándar de la media, % DRMS (MS Degradable en el rumen)= 1- [(g muestra pos-incubación ruminal – g de la bolsa vacía)/(g muestra incubada \*%MS de la muestra)]\*100; % MSNDR (MS no degradable en rumen digestible en intestino) = 100 - %DRMS; %MSNDRDI (MS no degradable en rumen digestible en el intestino delgado) = MSNDR \* DIMS; % MSInd (MS indigestible)= %MSNDR\*((100-%DIMS)/100); %DIMS (Digestibilidad intestinal de la MS) = 1- [(g muestra en heces – g de la bolsa vacía)/(g muestra incubada en abomaso\*%MS de la muestra)]\*100; % DMS aparente (Digestibilidad aparente de la MS) = 100 – MSInd

En el Cuadro 2 las mayores degradabilidades ruminales de la MS fueron para el pasto kikuyo (69.0%) y concentrado (84.7%), seguido de la MetP (60.2 %). La digestibilidad aparente de la MS para el concentrado y MetP fueron las más altas de todos los alimentos evaluados (91.8 y 85.2%). Los menores valores fueron obtenidos con LysP (35.7%).

Los valores de degradabilidad ruminal y digestión posruminal de la PC son presentados en el Cuadro 3. Los alimentos que presentaron mayores porcentajes de PCDR fueron el concentrado y el pasto kikuyo con 77.2 y 61.8%, respectivamente. Por lo tanto puede calcularse para estos dos alimentos que la

PNDR alcanzó el 22.8 y 38.2% respectivamente. Para la fuente de metionina protegida (MetP), se encontró una alta PCDR (66.7%) y un bajo aporte de PCNDR (33.3 %). Para LysP se obtuvo un porcentaje de PCDR y PCNDR de 11.4 y 88.6%, respectivamente. Esto evidencia claramente que la MetP no tiene una buena protección, mientras que la Lys si parece estar protegida de la degradación ruminal adecuadamente. Cuadro 3. Degradabilidad ruminal y digestión posruminal de la proteína de los alimentos evaluados. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013

Table 3. Ruminal degradability and post-ruminal digestion of protein from feeds evaluated. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013

| Parámetro <sup>1</sup> | Kikuyo |      | Concentrado |      | LysP  |      | MetP  |      |
|------------------------|--------|------|-------------|------|-------|------|-------|------|
|                        | Prom.  | EEM  | Prom.       | EEM  | Prom. | EE   | Prom. | EE   |
| PCDR, %PC              | 61.8   | 0.57 | 77.2        | 0.34 | 11.4  | 0.35 | 66.7  | 1.37 |
| PCNDR, %PC             | 38.2   | 0.57 | 22.8        | 0.34 | 88.6  | 0.35 | 33.3  | 1.37 |
| PCNDRDI, %PC           | 21.9   | 0.33 | 12.9        | 0.19 | 36.2  | 0.14 | 19.7  | 0.81 |
| PC Ind, % PC           | 16.2   | 0.24 | 9.85        | 0.15 | 52.4  | 0.21 | 13.6  | 0.56 |
| DIPC, % PNDR           | 57.5   | 1.28 | 56.8        | 0.45 | 40.9  | 0.77 | 59.2  | 2.27 |
| DPC aparente, % PC     | 83.8   | 0.24 | 90.2        | 0.15 | 47.6  | 0.21 | 86.4  | 0.56 |

<sup>1</sup> En el Cuadro son presentados la media y los errores estándar de la media, Prom: Promedio, EEM: Error estándar de la media, % PCDR (%PC degradable en rumen) = 100 - (%PCNDR), %PCNDR (PC no degradable en rumen) = (g MS en el residuo ruminal\* %PC en el residuo ruminal del alimento incubado)/gr MS incubado en el rumen \* % PC en el alimento)\*100, %PCNDRDI (%PC degradable en rumen digestible intestinalmente) = %PCNDR\*% DIPC/100, %PC Ind (%PC indigestible): [(gr de MS en heces\* %PC en las heces)/(gr de MS incubada en el abomaso\* %PC en el residuo ruminal)\*100; DIPC (Digestibilidad intestinal de la PC) = 100 - %PCIndigest; % DPC aparente (Digestibilidad aparente de la PC) = % PCDR + % PCNDRDI

Cuando se utilizan fuentes de AA protegidos se espera reducir su degradación ruminal, pero este efecto solo se observó para la LysP debido a que se encontró una degradabilidad ruminal de la PC de 11.4%. Sin embargo, fue encontrada también una más baja digestibilidad intestinal de la PNDR de LysP (40.9%) que para MetP (59.2%).

En los Cuadros 2 y 3 puede observarse también que la degradación ruminal de la MS y PC representan el porcentaje más alto de la digestibilidad total aparente, dejando una menor proporción para ser digestible intestinalmente. Las mayores

transformaciones y degradaciones del alimento se dan en el rumen, quedando una proporción muy baja disponible para su posterior digestión y absorción en el abomaso e intestino delgado. En este contexto, resulta fundamental para el animal maximizar el aporte de proteína y AA microbianos para cubrir sus requerimientos. Sin embargo, una mayor degradación de la PC y de los AA en el rumen no asegura en si misma un alto flujo de proteína microbiana hacia el ID, ya que si esta no está sincronizada con el aporte de energético de la ración será convertida en amoníaco y finalmente en urea.

En este trabajo, los valores promedios de la degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de la MS fueron mayores para el pasto kikuyo y el alimento concentrado que los encontrados por Correa et al. (2012) en vacas Holstein. Dichos autores reportan valores de 37.1 y 12.4% para el kikuyo y de 58.4% y 39.3% para el concentrado respectivamente lo que podría estar explicado por el menor tiempo de incubación ruminal que fue de tan solo 16 h. Acorde con los resultados del presente trabajo, una incubación ruminal de 24 horas para el pasto kikuyo y utilizando vacas con cánula duodenal, Caro y Correa (2006) reportan valores de DRMS y digestibilidad posruminal de la MS del orden de 56.0 % y 29.8%. Las diferencias entre estudios se explicarían principalmente por el tiempo de incubación ruminal que resultó diferente entre los tres trabajos. Es evidente por lo tanto, que el tiempo previo de incubación ruminal influye sobre la degradación y posterior digestibilidad intestinal de la MS, así como en los aportes de proteína y AA que llegan al intestino delgado.

Con relación a la degradabilidad ruminal de la MS de la LysP y MetP se puede observar que la Lys presentó un aceptable grado de protección mientras que la Met no (ver Cuadro 2). Sin embargo, cuando éstas llegan al ID, la Lys tiene baja digestibilidad intestinal mientras que la Met se digiere en una mayor cantidad. Las diferencias detectadas se explicarían en parte por los diferentes componentes con que se protegen los AA. Mientras que la Lys es protegida con ácidos grasos, la Met es protegida por una cubierta de etilcelulosa.

Rossi et al (2003) evaluando diferentes productos de MetP y LysP encuentran que son mayores las degradaciones ruminales a las 24 h para la Met protegida con ácidos grasos hidrogenados o jabones cálcicos que contienen ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono que para protecciones con etilcelulosa y polímeros sensibles al pH. Para la LysP fueron mayores las degradaciones para los ácidos grasos hidrogenados, jabones cálcicos con ácidos grasos C16 y C18 y triglicéridos conteniendo jabones cálcicos con ácidos grasos saturados que para las protecciones con triglicéridos (Rossi *et al.* 2003). Sin embargo, cuando fueron evaluadas las digestibilidades intestinales de los AA protegidos con diferentes productos se encuentra que es menor para la protección con etilcelulosa en la MetP y triglicéridos conteniendo jabones cálcicos con ácidos grasos saturados para LysP, que fueron específicamente las que tuvieron mayor protección ruminal. Esto confirma nuestros resultados, porque cuando mayor es la protección del AA a nivel ruminal también menor es su digestibilidad a nivel intestinal.

Por otra parte, resulta importante no solamente tener en cuenta el tipo de protección utilizada comercialmente, sino también el aminoácido que está siendo protegido y la naturaleza de los ácidos grasos que están incluidos en el jabón cálcico que forme parte de la protección. En efecto, las grasas hidrogenadas son pobremente digestibles en ID y la inclusión de ácidos grasos insaturados como el oleico puede mejorar la digestibilidad (Harvatine y Allen, 2006; Drackley et al., 2007).

En cuanto a la fracción proteica de los alimentos (Cuadro 3), las degradabilidades ruminales de la PC en el kikuyo y el concentrado fueron superiores al 60%. Para el pasto kikuyo, esto puede ser debido a las altas fertilizaciones nitrogenadas que incrementan el nitrógeno no proteico (NNP) en este forraje y el tipo de proteínas que constituyen el alimento. Se ha reportado que el kikuyo contiene hasta un 35.1% de N soluble (Marais, 2001) y que la principal y más importante proteína encontrada en forrajes frescos es la ribosa-1,5-bisfosfato carboxilasa o rubisco (McNabb et al., 1998). Dicho compuesto representa el 50-60% del contenido total de proteína y es rápida e intensamente degradada en el rumen. Otras proteínas,

como las presentes en las membranas de los cloroplastos resisten la degradación ruminal durante los primeros horarios de fermentación, pero completan su desaparición a las 48 horas (Aufrere et al., 1994a).

Para el caso de la proteína del concentrado, la razón para una alta degradabilidad ruminal radica en la naturaleza de las proteínas de sus componentes mayoritarios (maíz y torta de soya). Dichas proteínas son de tipo soluble como las albúminas y las globulinas para la torta de soya y proteínas de almacenamiento como prolaminas y glutelinas en el grano de maíz.

La torta de soya contiene en promedio un 46% de PC constituida principalmente por globulinas las que a su vez están compuestas de conglicininas y glicininas que resultan altamente degradables en el rumen Su desaparición ruminal resulta total entre las 2 y 24 h de incubación (Aufrere et al., 1994b; Sadeghi et al., 2006). A su vez, el grano de maíz contiene un 8-10% de PC, predominando las prolaminas (zeinas) y glutelinas (zeanina) (Hamaker et al., 1995) con degradabilidades de la PC entre el 70-80% en las primeras 12 h de incubación ruminal y más del 80% para las 24 h post-incubación (Herrera et al., 1990). Por lo expuesto, la contribución relativa de cada fracción proteica en los alimentos evaluados pudo influir significativamente en el total de proteína degradada en el rumen y afectar a su vez el patrón de AA que llegan al ID.

La degradación ruminal e intestinal de la PC del pasto kikuyo fue 61.8 y 21.9 % respectivamente valores consistentes con los reportados por Castañeda et al. (2008) y Caro et al. (2006) para esta misma especie forrajera. De igual forma y utilizando tiempos de incubación cercanos a los del presente trabajo los Caro y Correa (2006) informan para estas mismas variables valores de 60.9 % para la PCDR y 22.52 % para la PNDRDI. Valores inferiores fueron encontrados por Correa et al. (2010) en un trabajo *in vivo*.

En cuanto a los AA protegidos, la degradabilidad ruminal de la PC de la LysP (Cuadro 3) resultó mucho menor que la de MetP pero las digestibilidades intestinales de la PC (%PNDR) son menores para la LysP (40.9%) que para MetP



(59.2%). En este trabajo, la fuente con mayor protección de la degradación ruminal presentó menor digestibilidad intestinal lo que se tradujo en una menor digestibilidad aparente en el total del TGI. Como se comentó anteriormente, el AA que está protegido, el tipo de protección y los ácidos grasos contenidos en la fuente que protege al AA son factores que contribuyen a explicar las diferencias en las degradabilidades ruminales y digestibilidades intestinales. Es muy importante resaltar que al comparar los resultados obtenidos en el Cuadro 3 con el 5, los valores de degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal para LysP y MetP son similares, lo que significa que no es necesario determinar el contenido del AA dentro de la fuente (análisis costoso), sino que bastaría simplemente con la determinación de su contenido de PC.

Los resultados encontrados aquí, concuerdan con Lara et al. (2003), que evaluaron la metionina protegida (Mepron) en diferentes horarios de incubación ruminal in situ, encontrando que a las 24 horas el 58.2% de la PC y 44.3 mg/g del N se habían degradado en el rumen para este producto. Por otra parte, Berthiaume et al. (2000) evaluaron esta misma fuente de MetP y también encontraron una degradación ruminal de la MS bastante alta, la cual fue de 44.16% a tan sólo 16 h de incubación ruminal.

### **Perfil y digestibilidad de AA en los alimentos evaluados**

En los Cuadros 4 y 5 son presentados los aminogramas de los alimentos evaluados con sus respectivos valores de degradación ruminal y digestión posruminal.

Cuadro 4. Perfil de aminoácidos (% de la MS) en el alimento (Alim), en el residuo después de 27.4 h de incubación ruminal (RR) y en el residuo después de la incubación abomasal encontrado en las heces (RH) de las diferentes fuentes evaluadas. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013

Table 4. Amino acids profile (% of DM) of feeds (Alim), residue of ruminal incubation after 27.4 h (RR) and feaces (RH) of differents sources evaluated. San

Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013

| Amino ácidos       | Kikuyo            |      |      | Concentrado |      |      | LysP |      |      | MetP |      |      |
|--------------------|-------------------|------|------|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                    | Alim <sup>1</sup> | RR   | RH   | Alim        | RR   | RH   | Alim | RR   | RH   | Alim | RR   | RH   |
| Metionina (Met)    | 0.31              | 0.32 | 0.13 | 0.58        | 0.89 | 0.89 |      |      |      | 45.3 | 39.0 | 43.4 |
| Lisina (Lys)       | 0.95              | 0.98 | 0.46 | 1.09        | 1.54 | 1.54 | 37.7 | 35.8 | 30.1 |      |      |      |
| Leucina (Leu)      | 1.34              | 1.58 | 1.09 | 1.27        | 1.92 | 1.92 |      |      |      |      |      |      |
| Isoleucina (Ile)   | 0.81              | 0.96 | 0.66 | 0.88        | 1.4  | 1.4  |      |      |      |      |      |      |
| Valina (Val)       | 1.10              | 1.56 | 1.16 | 0.91        | 1.02 | 1.02 |      |      |      |      |      |      |
| Treonina (Thr)     | 0.32              | 0.43 | 0.33 | 0.65        | 1.01 | 1.01 |      |      |      |      |      |      |
| Fenilalanina (Phe) | 0.97              | 1.28 | 1.34 | 0.76        | 1.17 | 1.17 |      |      |      |      |      |      |
| Histidina (His)    | 0.31              | 0.41 | 0.3  | 0.39        | 0.6  | 0.6  |      |      |      |      |      |      |
| Alanina (Ala)      | 1.36              | 1.59 | 1.01 | 0.82        | 1.25 | 1.25 |      |      |      |      |      |      |
| Arginina (Arg)     | 0.85              | 1.13 | 1.25 | 0.92        | 1.32 | 1.32 |      |      |      |      |      |      |
| Asparagina (Asp)   | 2.24              | 2.85 | 2.28 | 1.84        | 2.88 | 2.88 |      |      |      |      |      |      |
| Glutamina (Glu)    | 1.95              | 2.45 | 1.96 | 3.55        | 5.16 | 5.16 |      |      |      |      |      |      |
| Glicina (Gly)      | 0.76              | 0.88 | 0.58 | 0.91        | 1.34 | 1.34 |      |      |      |      |      |      |
| Serina (Ser)       | 0.86              | 1.09 | 0.81 | 0.6         | 0.91 | 0.91 |      |      |      |      |      |      |
| Cistina (Cys)      | 0.17              | 0.23 | 0.17 | 0.57        | 0.8  | 0.8  |      |      |      |      |      |      |
| Tirosina (Tyr)     | 0.23              | 0.31 | 0.23 | 0.39        | 0.6  | 0.6  |      |      |      |      |      |      |
| Sumatoria          | 14.53             | 18.1 | 13.8 | 16.1        | 23.8 | 23.8 | 37.7 | 35.8 | 30.1 | 45.3 | 39.0 | 43.4 |

<sup>1</sup> Alim: Perfil de AA en el alimento, RR: Perfil de AA después de 27.4 h de incubación ruminal, RH: Perfil de AA del residuo encontrado en las heces después de la incubación abomasal.

Los contenidos de PC y perfil de AA del pasto kikuyo encontrados en este experimento (ver Cuadros 1 y 4) resultaron consistentes con lo publicado por Correa et al. (2008). Sin embargo, las concentraciones de PC y AA presentadas en este trabajo fueron más altas que para el forraje de 40 días de rebrote, y más bajas que para uno de 30 días de crecimiento, lo cual pudo deberse a que la PC del pasto kikuyo en este trabajo fue de 18.2%, valor más cercano al de 30 (17.8%) que al de 40 días de corte (14.4% de la PC). Además, la alta fertilización nitrogenada de las pasturas durante años, ha generado mayores concentraciones de nitrógeno en el suelo y por lo tanto, mayor contenido de proteína en el forraje.

De la comparación del perfil de AA esenciales (AAE) del pasto kikuyo y del alimento concentrado con los reportados para la proteína microbiana por Hvelplund (1986) surge que los AAE con un menor porcentaje relativo a la PMicrob fueron la Lisina (Lys), Treonina (Thr), Histidina (His) e Isoleucina (Ile)

para el forraje y la Lys para el alimento concentrado. Los datos presentados en el Cuadro 4 muestran claramente que el perfil de AA que ingresa al abomaso (perfil del residuo ruminal) es diferente al del alimento ofrecido (pasto kikuyo y concentrado). En el caso del pasto kikuyo, los AA de mayor intensidad de cambio fueron Val, Cys, Tyr, Thr, Arg, His y Phe con incrementos superiores al 32.0%. Para el alimento concentrado los AA que más variaron fueron Ile, Asp, Thr, Phe, His, Tyr y Met con incrementos mayores al 53.4%. Los dos AA que más variaron en el kikuyo y el concentrado fueron los de cadena ramificada (Val e Ile respectivamente), ya que estos son desaminados y descarboxilados por los microorganismos ruminales para producir ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (ácido isobutírico, isovalérico, valérico y 2-metilbutírico) necesarios para el crecimiento y síntesis de la proteína microbiana en el rumen (Ling et al., 2013).

En el Cuadro 5, se presentan los valores de degradabilidad ruminal y digestibilidad de los AA en los alimentos evaluados. La degradación ruminal de los AA para el kikuyo varío entre 56.0 y 68% para el valor mínimo y máximo respectivamente. En tanto, que para el concentrado los valores flucturaron entre 76.1 y 82.9%, lo que podría indicar una mayor disponibilidad de estos nutrientes para la microflora ruminal en el suplemento que en el forraje. Por otra parte, se encontró que para las fuentes de AA protegidos, la degradabilidad ruminal de LysP fue de 11.5% mientras que para MetP fue del 65.8% representando este último un valor demasiado elevado por tratarse de una fuente protegida. Esto provocó que la cantidad que pasó a abomaso e intestino delgado fuera mucho más baja en MetP que para LysP.

Cuadro 5. Degradabilidad ruminal y digestibilidad intestinal de los AA en los alimentos evaluados.

Table 5. Ruminal degradability and intestinal digestibility of amino acids in feeds evaluated.

| AA   | AADR, % AAI |         |      |      | AANDR, % AAI |         |      |      | AA DI, %AANDR |         |      |      | AANDRDI, %AAI |         |      |      | AA Ind, % AAI |         |      | AADT, %AAI |        |         |      |      |
|------|-------------|---------|------|------|--------------|---------|------|------|---------------|---------|------|------|---------------|---------|------|------|---------------|---------|------|------------|--------|---------|------|------|
|      | Kikuyo      | Concent | LysP | MetP | kikuyo       | Concent | LysP | MetP | Kikuyo        | Concent | LysP | MetP | Kikuyo        | Concent | LysP | MetP | Kikuyo        | Concent | LysP | MetP       | Kikuyo | Concent | LysP | MetP |
| Met  | 68.0        | 76.7    |      | 65.8 | 32.0         | 23.3    |      | 34.2 | 77.4          | 57.8    |      | 58.7 | 24.8          | 13.5    |      | 20.1 | 7.20          | 9.90    |      | 14.1       | 92.7   | 90.1    |      | 85,9 |
| Lys  | 68.0        | 78.4    | 11.5 |      | 32.0         | 21.6    | 88.5 |      | 74.3          | 54.5    | 42.1 |      | 23.8          | 11.8    | 37.2 |      | 8.20          | 9.90    | 51.3 |            | 91.8   | 90.1    |      | 48,8 |
| Leu  | 63.3        | 76.9    |      |      | 36.7         | 23.0    |      |      | 62.3          | 57.3    |      |      | 22.8          | 13.2    |      |      | 13.8          | 9.90    |      |            | 86.2   | 90.1    |      |      |
| Ile  | 63.4        | 75.8    |      |      | 36.6         | 24.2    |      |      | 62.3          | 59.3    |      |      | 22.8          | 14.4    |      |      | 13.8          | 9.90    |      |            | 86.2   | 90.1    |      |      |
| Val  | 56.0        | 82.9    |      |      | 43.8         | 17.1    |      |      | 59.3          | 42.2    |      |      | 26.1          | 7.30    |      |      | 17.9          | 9.90    |      |            | 82.1   | 90.1    |      |      |
| Thr  | 58.8        | 76.4    |      |      | 41.2         | 23.6    |      |      | 57.8          | 58.3    |      |      | 23.8          | 13.8    |      |      | 17.4          | 9.90    |      |            | 82.6   | 90.1    |      |      |
| Phe  | 59.3        | 76.6    |      |      | 40.7         | 23.4    |      |      | 42.6          | 57.8    |      |      | 17.4          | 13.5    |      |      | 23.4          | 9.90    |      |            | 76.7   | 90.1    |      |      |
| His  | 58.7        | 76.4    |      |      | 41.3         | 23.6    |      |      | 60.7          | 58.2    |      |      | 25.1          | 13.7    |      |      | 16.2          | 9.90    |      |            | 83.8   | 90.1    |      |      |
| Arg  | 58.8        | 78.1    |      |      | 41.2         | 21.9    |      |      | 39.6          | 55.1    |      |      | 16.3          | 12.1    |      |      | 24.9          | 9.90    |      |            | 75.1   | 90.1    |      |      |
| Ala  | 63.7        | 76.6    |      |      | 36.3         | 23.4    |      |      | 71.4          | 57.8    |      |      | 25.9          | 13.5    |      |      | 10.4          | 9.90    |      |            | 89.6   | 90.1    |      |      |
| Asp  | 60.6        | 76.1    |      |      | 39.4         | 23.9    |      |      | 56.2          | 58.8    |      |      | 22.1          | 14.1    |      |      | 17.2          | 9.90    |      |            | 82.8   | 90.1    |      |      |
| Glu  | 61.1        | 77.8    |      |      | 38.9         | 22.2    |      |      | 56.2          | 55.7    |      |      | 21.9          | 12.4    |      |      | 17.0          | 9.90    |      |            | 83.0   | 90.1    |      |      |
| Gly  | 64.3        | 77.5    |      |      | 35.7         | 22.5    |      |      | 42.3          | 56.2    |      |      | 15.1          | 12.6    |      |      | 20.6          | 9.90    |      |            | 79.4   | 90.1    |      |      |
| Ser  | 60.6        | 76.6    |      |      | 39.4         | 23.4    |      |      | 59.3          | 57.9    |      |      | 23.4          | 13.5    |      |      | 16.0          | 9.90    |      |            | 84.0   | 90.1    |      |      |
| Cys  | 58.6        | 78.6    |      |      | 41.4         | 21.4    |      |      | 57.9          | 53.9    |      |      | 24.0          | 11.5    |      |      | 17.4          | 9.90    |      |            | 82.6   | 90.1    |      |      |
| Tyr  | 58.8        | 76.3    |      |      | 41.2         | 23.7    |      |      | 59.0          | 58.4    |      |      | 24.3          | 13.8    |      |      | 16.9          | 9.90    |      |            | 83.1   | 90.1    |      |      |
| Prom | 61.5        | 77.4    | 11.5 | 65.8 | 38.5         | 22.6    | 88.5 | 34.2 | 58.3          | 56,3    | 42.1 | 58.7 | 22.4          | 12.7    | 37.2 | 20.1 | 16.1          | 9.90    | 51.3 | 14.1       | 83.9   | 90.1    | 48.8 | 85.9 |
| EEM  | 0.71        | 0.51    | 0.35 | 1.41 | 0.71         | 0.51    | 0.35 | 1.41 | 0.31          | 0.97    | 0.75 | 2.34 | 0.48          | 0.36    | 0.15 | 0.83 | 0.21          | 0.14    | 0.67 | 0.80       | 0.21   | 0.14    | 0.16 | 0.52 |

AADR: Porcentaje de AA degradable en el rumen. AANDR: Porcentaje del AA no degradable en el rumen. AA DI: Porcentaje de digestibilidad del AANDR, AANDRDI: Porcentaje del AA no degradable en rumen digestible intestinalmente, AA Ind: Porcentaje del AA indigestible, AADT: Digestibilidad total aparente de los AA, AAI: Aminoácido inicial incubado, AAE- aminoácidos esenciales: Met – metionina, Lis – lisina, Leu – leucina, Ile – isoleucina, Val – valina, Thr – treonina, Phe – fenilalanina, His – histidina, Arg – arginina, AANE- aminoácidos no esenciales: Ala – alanina, Asp – aspartato, Glu: glutamina, Gly – glicina, Ser – serina, Cys – cistina, Tyr – tirosina, Prom: Media aritmética =  $\sum AA/n$ , donde n= 16. San Pedro de los Milagros, Antioquia, Colombia. 2013.

Como ya fue comentado, los aminoácidos de mayor desaparición ruminal (AADR como % del AA inicial incubado) para el pasto kikuyo fueron la Met y la Lys mientras que para el concentrado fueron la Val, Cys y Lys. Por otra parte, los AA más digestibles de la PNDR fueron en su orden Val, Ala, His y Met para el kikuyo e Ile y Asp para el alimento concentrado. Estas diferencias en la degradación y digestibilidad de los AA individuales entre el pasto kikuyo y el concentrado puede depender principalmente de la degradación de la proteína en la cuales ellos están incluidos lo que a su vez es función de las diferencias entre las proteínas constitutivas del alimento, como albúminas, globulinas (altamente degradables en rumen), prolamina y glutaminas (con mayor resistencia a la degradación ruminal). Adicionalmente, estos valores también son influenciados por la solubilidad y estructura de las proteínas que contienen los aminoácidos y su aminograma (Taghizadeh et al., 2005). Podría pensarse que la composición de AA en las proteínas que escapan de la degradación ruminal en el pasto kikuyo es mayor debido a que la susceptibilidad a la degradación es menor por estar compuesto de tejidos vegetales mientras que, la menor degradación ruminal y aporte intestinal de AA desde los alimentos concentrados puede deberse a que algunas de las fuentes de proteína comúnmente usadas para la producción animal, son expuestas a calor, presión o alcalosis y este tipo de condiciones hace que ciertos AA reaccionen con otros compuestos presentes en el alimento, resultando en compuestos no disponibles nutricionalmente y disminuyendo la biodisponibilidad de los AA en el ID (Hurrell y Carpenter, 1981).

Los AA más degradables y digestibles en todo el tracto gastrointestinal (considerando el AA que se degrada en el rumen y el que se absorbe intestinalmente que viene desde la PNDR) fueron Lys y Met para el pasto kikuyo (92.7 y 91.8 % como % del AAI respectivamente). Al parecer estos dos AA son requeridos en mayor cantidad tanto por los microorganismos ruminales como por el animal. Por otra parte, AA como la Gly, Arg y Phe en el pasto kikuyo son los AA que llegan en mayor cantidad al ID pero se absorben en menor porcentaje (15.1, 16.3 y 17.4% respectivamente), mientras que para el suplemento comercial dichos AA fueron Val con 7.30, Cys 11.5 y Lys 11.8 %. El caso de la Val llama la

atención debido a que, aunque fue el AA con el menor aporte y absorción en el ID desde el concentrado, en el forraje sucedió lo contrario, es decir, tuvo la menor degradabilidad ruminal y mayor aporte al ID, por lo que el kikuyo podría compensar muy posiblemente las deficiencias que pudieran presentarse de este AA en un sistema basado en forrajes y concentrado.

Los resultados del Cuadro 5 sugieren que la LysP presentó una mejor protección que la Met debido a que sólo el 11.5 % se degrada en el rumen con una mayor cantidad de Lys al ID (88.5%) mientras que la MetP es degradada a nivel ruminal en un 65.8% y sólo pasa al abomaso e intestino un 34.2%. Sin embargo, la DI fue mucho más baja para la LysP que para la MetP lo que muestra claramente que el método de protección también impide su absorción a nivel intestinal.

La digestibilidad intestinal para ambos AA protegidos fue diferente siendo la MetP superior en un 16.6%. Sin embargo, la LysP presentó una menor degradabilidad en el rumen y por lo tanto un mayor aporte de PNDRDI (% AAI) comparada con la fuente de MetP. Puede concluirse que el mayor grado de protección fue alcanzado en el producto LisP y que el método de protección del AA a nivel ruminal va en detrimento de su digestibilidad intestinal generando finalmente mayores pérdidas del producto en las heces debido a una restringida disponibilidad y digestibilidad en el rumen, abomaso e ID (ver resultados de AADT, % AAI para la LysP y MetP). Un desarrollo de protección más efectivo resulta necesario para la METya que la estimación de la cantidad de MetP que pasa al abomaso e intestino resultó muy bajala que reduce el aporte de Met al utilizar esta fuente de AA protegido. Es necesario resaltar también, que a pesar de ser la Met una fuente con menor protección que la Lys, su digestibilidad en el TGI fue elevada (85.9%) en relación al valor estimado para la Lys (48.8%). Puede especularse que aunque llega menor cantidad de Met al ID una parte es utilizada en el rumen lo que implicaría un mayor aprovechamiento de este producto por parte del animal en caso de presentar efectos positivos en la producción de proteína microbiana. De todo lo expuesto surge que los AA protegidos deben ser evaluados teniendo en cuenta tanto su degradabilidad ruminal como su

digestibilidad intestinal para poder contar con elementos más precisos para definir el grado correcto de inclusión de estos productos en la dieta para vacas lecheras. Los resultados sugieren que no siempre una alta efectividad de protección ruminal será acompañada de una alta disponibilidad en el intestino delgado y viceversa.

### **Conclusiones**

El forraje y el concentrado presentaron los mayores niveles de degradación de los AA en el rumen alcanzando valores promedio de 61.5 y 77.4% para el kikuyo y el concentrado respectivamente. Como consecuencia, una menor proporción de AA estará disponible para su posterior digestión y absorción en abomaso e intestino. De la cantidad de AA no degradable en rumen que llega al ID sólo se absorbe en promedio el 58.3 y 56.3% para todos los AA evaluados.

La protección ruminal para la LysP fue alta como consecuencia de una baja degradación ruminal mientras que para la MetP la cantidad degradada en el rumen fue mayor al 50%. Sin embargo, la efectividad del método de protección ruminal fue en detrimento de su digestión a nivel intestinal.

### **Agradecimientos**

Universidad de Antioquia por la financiación, proyecto CODI 20113014 y sostenibilidad al grupo Biogénesis 2013-2014; Colciencias por la beca doctoral de uno de los autores de este artículo. A Ajinomoto y Evonik por las fuentes de aminoácidos protegidos de lisina y metionina y el asesoramiento.

## Bibliografía

AOAC. 1990. Fiber (Acid Detergent) and Lignin in Animal Feed. (973.18). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis. In Association of Official Analytical Chemists. 17 th ed, Arlington, VA.

Aufrere, J., D. Boulberhane, D. Graviou, J.P. Andrieu, C. Demarquilly. 1994a. Characterisation of in situ degradation of Lucerne proteins according to forage type (green forage, hay and silage) using gel electrophoresis. Animal Feed Science and Technology 50:75-85

Aufrere, J., D. Graviou, y B. Michalet-Doreau. 1994b. Degradation in the rumen of proteins of 2 legumes: soybean meal and field pea. Reproduction Nutrition Development 34:483-490

Bach, A., G. Huntington, y M. Stern. 2000. Response of nitrogen metabolism in preparturient dairy cows to methionine supplementation. Journal of Animal Science 78:742–749

Bartocci, S., A. Amici, M. Verna, S. Terramoccia, y F. Martillotti. 1997. Solid and fluid passage rate in buffalo, cattle and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios. Livestock Production Science 52:201-208.

Berthiaume, R., H. Lapierre, M. Stevenson, N. Cote, y B. McBride. 2000. Comparison of the *In Situ* and *In Vivo* intestinal disappearance of ruminally protected methionine. Journal of Dairy Science 83:2049–2056

Benefield, B., R. Patton, M. Stevenson, y T. Overton. 2009. Evaluation of rumen-protected methionine sources and period length on performance of lactating dairy cows within Latin squares. Journal of Dairy Science 92(9):4448-55.



Cabrita, A., R. Dewhurst, D. Melo, J. Moorby, y A. Fonseca. 2011. Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. *Journal of Dairy Science* 94(9):4647-56.

Campos, W., E. Benedetti, N. Rodríguez, E. Saliba y A. Borges. 2007. Cinética ruminal de vacas leiteiras a pasto consumiendo diferentes gramíneas tropicais. *Archivos de Zootecnia*. 56(216):829-837.

Caro, F., y H.J. Correa. 2006. Digestibilidad posruminal aparente de la materia seca, la proteína cruda y cuatro macrominerales en el pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livestock Research for Rural Development* 18 (143).

Castañeda, M., M. Duque, R.D. Galvis, y H.J. Correa. 2008. Efecto de la fertilización nitrogenada y de la edad de corte sobre la digestibilidad intestinal *In vitro* de la proteína del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum Hochst*). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín* 61(2):4646-4653

Chiou, P.W., K. Kuo, J. Hsu, y B. Yu. 1995. Studies on the protein degradabilities of feedstuffs in Taiwan. *Animal Feed Science and Technology* 55:215–226.

Correa, H.J., M.L. Pabón, y J.E. Carulla. 2008. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I - Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livestock Research for Rural Development* 20 (4).

Correa, H.J., Y. Rodríguez, y L. Jaimes. 2010. Incubación posruminal de bolsas móviles de nylon mediante una sonda de incubación abomasal. *Livestock Research for Rural Development* 22 (157).

Correa, H.J., Y. Rodríguez, M. Pabón, y J. E. Carulla. 2012. Efecto de la oferta de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción, la calidad de la leche y el balance de nitrógeno en vacas Holstein. *Livestock Research for Rural Development* 24 (204).

Davidson, S., B. Hopkins, J. Odle, C. Brownie, V. Fellner, y L. Whitlow. 2008. Supplementing limited methionine diets with rumen-protected methionine, betaine, and choline in early lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 91(4):1552–1559

Drackley, J.K., T.R. Overton, G. Ortiz-Gonzalez, A.D. Beaulieu, D.M. Barbano, J.M. Lynch, y E.G. Perkins. 2007. Responses to increasing amounts of high-oleic sunflower fatty acids infused into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90:5165-5175.

Galyean M L 1997 Laboratory procedures in animal nutrition research; West Texas A&M University, Division of Agriculture and Texas A&M Research and Extension Center, Amarillo. 192 p. [http://apps.depts.ttu.edu/afs/home/mgalyean/lab\\_man.pdf](http://apps.depts.ttu.edu/afs/home/mgalyean/lab_man.pdf)

García, J., J.J. Zuluaga, y J. Suescún. 2009. Evaluación de la técnica de bolsa móvil de nylon para determinar la digestibilidad de proteína cruda en cerdos. *Revista Lasallista de Investigación* 6 (2):24-30.

Gargallo, S., S. Calsamiglia, y A. Ferret. 2006. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science* 84(8):2163-2167.

Hamaker, B.R., A.A. Mohamed, J.E. Habben, C.P. Huang, y B.A. Larkins. 1995. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chemistry Journal* 72(6):583-588.

Harvatine, K.J., y M.S. Allen. 2006. Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89:1092-1103.

Herrera, R.E., J.T. Huber, y M.H. Poore. 1990. Dry matter, crude protein, and Starch degradability of five cereal grains. *Journal of Dairy Science* 73:2386-2393.

Holden, L.A., L.D. Muller, y S.L. Fales. 1994. Estimation of intake in grazing grass pasture high producing Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 77:2332-2340

Hurrell, R.F., y K.J. Carpenter. 1981. The estimation of available lysine in foodstuffs after Maillard reactions. *Progress in Food and Nutrition Science* 5:159-176.

Hvelplund, T. 1986. The influence of diet on nitrogen and amino acid content of mixed rumen bacteria. *Acta Agriculturae Scandinavica* 36:325–331.

IDEAM -Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales-. 1997. Zonificación Ecológica de Colombia usando las Zonas de Vida de Holdridge. C.D. IDEAM, Bogotá, Colombia.

Kendall, C., C. Leonardi, P.C. Hoffman, y D.K. Combs. 2009. Intake and milk production of cows fed diets that differed in dietary neutral detergent fiber and neutral detergent fiber digestibility. *Journal of Dairy Science* 92:313–323 doi:10.3168/jds.2008-1482

Kudrna, V., J. Illek, M. Marounek, y A. Nguyen. 2009. Feeding ruminally protected methionine to pre- and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. *Czech Journal of Animal Science* 54(9):395–402

Lara, A., G. Mendoza, y J. Bárcena. 2003. Degradabilidad ruminal in situ e in vitro de la metionina protegida. *Revista Técnica Pecuria en México* 41(1):91-103

Ling, H., Y. Chen, X. Li, y Y. Xia. 2013. Effects of Branched-chain amino acids on *in vitro* ruminal fermentation of wheat straw. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences* 26:523-52.

Marais, JP. 2001. Factors affecting the nutritive value of kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) - a review. *Tropical Grasslands*. 35: 65 – 84.

McNabb, W.C., J.S. Peters, L.Y. Foo, G.C. Waghorn, y F.S. Jackson. 1998. Effect of condensed tannins prepared from several forage on the In Vitro precipitation of

ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (Rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77:201-212.

Misciattelli, L., V. Kristensen, M. Vestergaard, M. Weisbjerg, K. Sejrsen, y T. Hvelplund. 2003. Milk production, nutrient utilization, and endocrine responses to increased postruminal lysine and methionine supply in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 86: 275–286.

Nollet, L. 2000. *Food analysis by HPLC*. Vol 100. New York.

NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, 7th Revised Edition, National Academy Press, Washington, DC.

Pereira, J., M. Ribeiro, R. Mendonça, y B. Pacheco. 2005. Avaliação de Modelos Matemáticos para o Estudo da Cinética de Passagem de Partículas e de Fluidos por Bovinos em Pastagem Recebendo Suplementos Contendo Diferentes Níveis de Proteína Não-Degradável no Rúmen. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34(6):2475-2485.

Piepenbrink, M., A. Marr, M. Waldron, W. Butler, T. Overton, M. Vázquez-Añón, y M. Holt. 2004. Feeding 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid to periparturient dairy cows improves milk production but not hepatic metabolism. *Journal of Dairy Science* 87: 1071–1084.

Ramanzin, M., G. Bittante, y L. Bailoni. 1991. Evaluation of Different Chromium-Mordanted Wheat Straws for Passage Rate Studies. *Journal of Dairy Science* 74:2989-2996

Robinson, P. 2009. SHIELD Dairy Ration Evaluator. Department of Animal Science, UC Davis, Davis, CA, USA.

Robinson, P. 1996. Rumen protected amino acids for dairy cattle: What is the future? *Animal Feed Science and Technology* 19:81–86.

Rossi, F., M. Moschini, F. Masoero, G. Cavanna, y G. Piva. 2003. Rumen degradation and intestinal digestibility of rumen protected amino acids: comparison between in situ and in vitro data. *Animal Feed Science and Technology* 108:223–229

Rulquin, H., y L. Delaby. 1997. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. *Journal of Dairy Science* 80:2513– 2522.

Sadeghi, A., A. Nikkhah, P. Shawrang, y M. Shahrehabak. 2006. Protein degradation kinetics of untreated and treated soybean meal using SDS-PAGE. *Animal Feed Science and Technology*. 126: 121–133

Schwab, C., C. Bozak, N. Whitehouse, y M. Messbah. 1992. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation: sequences of lysine and methionine limitation. *Journal of Dairy Science* 75:3486–3502.

Socha, M., D. Putnam, B. Garthwaite, N. Whitehouse, N. Kierstead, C. Schwab, G. Ducharme, y J. Robert. 2005. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 88:1113–1126.

Swanepoel, N., P. Robinson, y L. Erasmus. 2010. Amino acid needs of lactating dairy cows: impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* 157:79–94.

Taghizadeh, A., M. Danesh, R. Valizadeh, F.E. Shahroodi, y K. Stanford. 2005. Digestion of Feed Amino Acids in the Rumen and Intestine of Steers Measured Using a Mobile Nylon Bag Technique. *Journal of Dairy Science* 88(5):1807-14

Udén, P., P.E. Colucci, y P.J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 31:625-632.

Van Soest, P., J. Robertson y B. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597

Van Straalen, W.M., J.J. Odiga, y W. Mostert. 1997. Digestion of feed amino acids in the rumen and small intestine of dairy cows measured with nylon-bag techniques. *British Journal of Nutrition* 77:83–97.

Weiss, W.P., H.R. Conrad y N.R. St. Pierre. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39 (1-2): 95-110

#### **CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS EN EL CONSUMO DE ALIMENTO, FLUJO INTESTINAL DE LA PROTEÍNA Y PRODUCCIÓN DE LECHE DE VACAS HOLTEIN**

Este capítulo permitió cumplir con el primer y segundo objetivo específico de la tesis:

Determinar el efecto de la suplementación con aminoácidos protegidos sobre la cantidad de proteína metabolizable en vacas lecheras.

Evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos protegidos sobre la producción de leche en vacas lecheras entre 80 a 150 días en lactancia.

En este capítulo, apoyado en un software de fácil y libre utilización (Amino Cow), a partir de datos de entrada como el consumo de materia seca (CMS) del forraje y producción de proteína microbiana (PMicrob) teóricos y CMS del concentrado y PNDR del forraje y concentrado reales (datos obtenidos del capítulo 3), fue estimada la cantidad de proteína metabolizable (PM) de la dieta, los requerimientos de Lys y Met y los aportes de la dieta para estos dos AA en cada uno de los animales experimentales, antes de realizar la suplementación con las fuentes protegidas de aminoácidos. El programa finalmente, arrojó las estimaciones de los balances de Met y Lys.

Posteriormente, se pasó a suplementar los animales con las cantidades adecuadas para cubrir las deficiencias de estos dos AA y se evaluó el efecto de estos sobre el consumo de alimento, flujo intestinal de proteína y producción de leche.

## **CAPÍTULO 4. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA Y LISINA PROTEGIDAS EN EL CONSUMO DE ALIMENTO, FLUJO INTESTINAL DE LA PROTEÍNA Y PRODUCCIÓN DE LECHE DE VACAS HOLSTEIN**

M Duque <sup>1,2</sup> M.Sc, R R Noguera,<sup>1</sup> Ph.D, M Olivera,<sup>2\*</sup> Dr.Sci.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA. Medellín, Colombia. <sup>2</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación Biogénesis. Medellín, Colombia. \*Correspondencia: jaime.rosero@udea.edu.co

### **RESUMEN**

El objetivo principal de este trabajo de investigación fue evaluar el efecto de la suplementación de metionina y lisina protegidos en vacas lecheras sobre el consumo de materia seca, flujo de aminoácidos al intestino delgado, producción y composición de la leche. El experimento fue realizado en 12 vacas Holstein multíparas con un promedio de producción de  $24 \pm 4.76$  kg/día entre 2 y 4 partos, con  $126 \pm 14$  días en lactancia. Los animales fueron introducidos aleatoriamente a uno de los dos tratamientos experimentales, los cuales fueron: Control: Animales consumiendo pasto kikuyo y concentrado, sin suplementación con aminoácidos protegidos, MetLys: Animales consumiendo pasto kikuyo y concentrado más suplementación de metionina y lisina protegidas (75 gr MetP y 190 grLysP en promedio respectivamente). El período experimental fue de 20 días, en el cual los primeros 14 días fueron de adaptación a la dieta y los siguientes 6 fueron para recolección de datos y toma de muestras. El consumo de materia seca del forraje fue similar entre el grupo control (11.5) y MetLys (11.9 Kg CMS/vaca/día) ( $p > 0.05$ ). La proteína metabolizable fue mayor en MetLys que en el grupo control ( $p < 0.05$ ), debido a la más alta producción de proteína microbiana que en el grupo control ( $p < 0.05$ ). Los aportes y balances de metionina y lisina que llegan al intestino delgado fueron diferentes entre grupos, siendo mejor en MetLys porque el suministro de aminoácidos protegidos y la producción de proteína microbiana fueron significativamente más altos ( $p < 0.05$ ) en este grupo experimental. No fueron encontradas diferencias significativas en producción, producción de grasa,



sólidos no grasos, proteína entre grupos experimentales ( $p>0.05$ ). Hubo una tendencia hacia el incremento de la producción de leche corregida al 4% de grasa ( $p=0.08$ ) y lactosa ( $p=0.10$ ). Las concentraciones de metabolitos como BHB y MUN no fueron modificados con la suplementación.

## **Introducción**

La información sobre los efectos de un adecuado aporte y balance de aminoácidos (AA) limitantes sobre el incremento de la eficiencia en el uso de la proteína y el mejoramiento de la respuesta productiva en vacas lecheras es aún escasa y ha constituido un importante desafío para investigadores y nutricionistas. En monogástricos, las raciones son normalmente formuladas para cubrir los requerimientos de proteína metabolizable y AA, lo cual ha contribuido a mejorar la respuesta productiva y a reducir los costos de producción. Puede por lo tanto hipotetizarse que los beneficios potenciales de lograr un correcto balance de las raciones con AA específicos podría ser de igual importancia en rumiantes (Robinson, 2010).

En los rumiantes el perfil de AA que llega al intestino delgado (ID) está determinado por la proteína microbiana producida en el rumen (PMicrob), la proteína no degradable en el rumen (PNDR) y la proteína endógena (PE). La PMicrob resulta de muy alta calidad debido a su adecuado perfil de AA, mientras que la PNDR que puede representar de un 40 a 50% de la proteína metabolizable (PM), es mucho más variable en su perfil de AA resultando en general de más baja calidad que la PMicrob (Iskenderov y Mamedova 2013). Ambas fuentes de proteína son por lo tanto importantes y deben ser consideradas en la evaluación y formulación de raciones, aunque en la práctica su determinación es difícil usando los actuales modelos para predecir los requerimientos y aportes de la dieta. Algunos modelos como el National Research Council (NRC, 2001), Dairy Ration Evaluator (Shield, Robinson 1998), Amino Cow (Amino Cow, 2010), Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS, O'Connor 1993), Cornell-Penn-Miner Dairy program (CPM Dairy, Swanepoel et al 2010a) y Agriculture Modeling and

Training Systems (AMTS) han sido utilizados para la determinación del balance de AA en vacas lecheras, aunque la falta de precisión de los requerimientos en AA absorbibles en el intestino y su suministro han limitado su uso, problema que se amplifica en sistemas de pastoreo debido a la mayor complejidad asociada a la obtención de esta información. El Aminocow (AC) es un programa de aplicación práctica, de libre acceso y muy útil para determinar los requerimientos y aportes de AA en la dieta, empleando investigación científica y actual. Este programa fue creado en respuesta a las necesidades de los nutricionistas en campo, que buscaban definir cuando y como se podía suplementar con Met protegida, además porque el uso de CPM / CNCPS que era el único programa disponible para equilibrar los AA en las raciones de vacas lecheras requería mucho tiempo y era complicado su uso en campo. Adicionalmente, en un estudio de metaanálisis realizado por Patton (2010) evaluó las predicciones del NRC y del AC para flujo de Lys, Met y de PM y no encontró diferencias en el flujo de estos dos AA, ni en la Met y Lys como % de la PM, pero si hubo diferencias en el flujo de PM, siendo menor para el AC.

Diferentes investigaciones han sido conducidas con la finalidad de incrementar el suministro de PNDR y AA al duodeno en vacas lecheras (Piepenbrink et al 1996). Se ha determinado que la concentración de metionina (Met) y lisina (Lys) en la PM son los AA más limitantes en una amplia variedad de raciones (Schwab 1976, NRC 2001). De hecho, la Met es típicamente reconocida como el primer AA limitante y la suplementación con Met ha mejorado la respuesta productiva en vacas lecheras (Armentano et al 1997, Rulquin and Delaby 1997). Sin embargo, existe discrepancia respecto a cual AA es el más limitante para la producción de leche y se postula que después de la Lys y Met, los AA más limitantes para la síntesis de proteína láctea serían la leucina (Garnsworthy et al, 2008), fenilalanina, isoleucina, treonina (Nichols et al 1998, Piepenbrink and Schingoethe 1998, Liu et al 2000), histidina y arginina (Vanhatalo et al 1999, Korhonen et al 2000; Kim et al 2001). Este hecho sugiere que obtener un correcto balance en AA en la dieta resulta una tarea bastante compleja.

Por otra parte, las respuestas en producción de leche a la suplementación con Met y Lys han sido variables siendo en algunos casos positivas en el incremento de la producción, contenido y producción de proteína láctea (Lara et al 2006, Robinson, 2010) mientras que en otros se ha logrado solamente un aumento en el consumo de alimento (Rulquin, 1992 and Schwab et al., 1993, Robinson, 2010). Otros autores (Swanepoel et al., 2010) suplementando con Lys protegida (LysP) para liberar 41 g de Lys/vaca/día en el ID, encontraron efectos adversos como disminución de la producción de proteína y grasa en la leche. En otro estudio con infusión de Lys y/o Met al abomaso al 140% de los requerimientos de dichos AA absorbibles en intestino, se registró un menor consumo, producción de leche y lactosa con una tendencia a menos proteína secretada cuando la infusión fue solamente con Met o fue en conjunto con la Lys (Robinson et al 2000). Esta falta de respuestas consistentes exige información adicional sobre AA limitantes en diferentes etapas de la lactancia y en diversos sistemas de alimentación.

El objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas sobre el consumo de alimento, el aporte de proteína metabolizable, la producción y composición de la leche de vacas Holstein en pastoreo.

## **Materiales y métodos**

### ***Localización, animales y manejo***

El trabajo fue desarrollado en la finca Betania, localizada en Santa Rosa de Osos (Antioquia, Colombia), a 2500 msnm y 14°C de temperatura promedio. Fueron seleccionadas 12 vacas de raza Holstein, multíparas (2 y 4 partos) con  $126 \pm 14$  días en lactancia. Al inicio de la prueba, los animales presentaron una producción promedio de  $24.0 \pm 4.76$  l/día de leche con  $2.89 \pm 0.17\%$  de proteína y  $3.34 \pm 0.42$  % de grasa butirosa. El peso promedio fue de  $574.1 \pm 56.2$  Kg y la nota promedio de condición corporal fue de  $3.02 \pm 0.2$ . Los animales fueron aleatoriamente asignados a uno de los dos tratamientos experimentales. El período experimental

tuvo una duración de 20 días (desde el 3 al 23 enero de 2014), en el cual los primeros 7 días fueron de adaptación a la dieta y los siguientes 13 fueron para recolección de datos y toma de muestras.

Los animales fueron manejados en un sistema de pastoreo rotacional por franjas con una oferta de 13 Kg de MS/vaca/día de pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Además de pastura, los animales recibieron en promedio  $7.6 \pm 0.29$  Kg/vaca/día de un suplemento comercial ofrecido por mitades al momento de cada ordeño (5:00 y 14:00 h). Los animales dispusieron de agua y sal mineral a voluntad en la parcela de pastoreo. La cantidad diaria de concentrado ofrecido fue ajustado según el nivel de producción a razón de 1 Kg de alimento concentrado cada 3 Kg de leche producida.

### **Alimentos evaluados y dieta de los animales**

Los alimentos fueron los componentes de una dieta completa para vacas lecheras que normalmente incluyen al pasto kikuyo y al suplemento comercial. Adicionalmente, fueron incluídas en la ración dos fuentes de AA protegidos: MetP (Metionina protegida) y LysP (Lisina protegida).

Los alimentos fueron analizados para determinar su composición química según los métodos descritos en el AOAC (2002) en el laboratorio NUTRILAB y de Nutrición Animal pertenecientes a la Universidad de Antioquia, ubicados en la Sede de Investigación Universitaria y la Facultad de Ciencias Agrarias, respectivamente. Las concentraciones de MS total, PC y cenizas fueron determinadas de acuerdo a los métodos 934.01, 976.05 y 923.03 de AOAC, (2002) y el contenido de extracto etéreo (EE) de acuerdo a la AOAC (1995). La FDN, fibra en detergente ácida (FDA) y lignina en detergente ácido (LDA) obtenidos por la metodología descrita por Van Soest et al (1991) y AOAC, método 973.18 procedimiento C y D (1990). En el residuo de la FDA se determinó el contenido de PC para determinar la PC insoluble en el detergente ácido (PCIDA).

El contenido de Met en la MetP y de Lys en la LysP fueron determinados por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) (Nollet, 2000) mientras que el

contenido del total de nutrientes digestibles (TDN) del forraje y el alimento concentrado fue estimado utilizando el procedimiento propuesto por Weiss et al (1992), que parte de calcular las digestibilidades verdaderas de los CNE (dvCNE), de la PC (dvPC), del FDN (dvFDN) y del EE (dvEE), basado en la composición química de los alimentos (Ver tabla 1). Para el concentrado fue usada la siguiente ecuación con el fin de corregir el contenido de TDN para este alimento. El forraje por tener un TDN menor o igual a 60.0% no requirió de este ajuste.

$$\text{Descuento de TDN (Mcal/Kg)} = \frac{\left( \text{TDN1X} - \left( (0.18 * \text{TDN1X}) - 0.13 \right) \right) * \text{Consumo}}{\text{TDN1X}}$$

Tabla 1. Composición química de los alimentos consumidos por las vacas lecheras utilizadas en el ensayo.

|                        | Kikuyo            | Concentrado       | MetP              | LysP              |
|------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| MS total, %            | 10.9              | 90.2              | 98.2              | 97.4              |
| PC, % MS               | 18.2              | 17.1              | 43.9              | 56.3              |
| TDN, % MS              | 60.4 <sup>3</sup> | 76.0 <sup>3</sup> |                   |                   |
| EE, % MS               | 3.12              | 3.9               | 1.00 <sup>1</sup> | 42.7              |
| FDN, % MS              | 56.4              | 21.8              | 3                 |                   |
| FDA, % MS              | 31.4              | 16.5              |                   |                   |
| LDA, % MS              | 6.35              | 3.83              |                   |                   |
| PCIDA                  | 1.8               | 1.1               |                   |                   |
| CNE, % MS              | 11.4              | 47.2              |                   |                   |
| ENL (Mcal/Kg de MS)    | 1.36              | 1.77              | 1.94 <sup>1</sup> | 3.26 <sup>2</sup> |
| Cenizas, % MS          | 10.9              | 10                | 1.50 <sup>1</sup> |                   |
| Ca, % MS               | 0.34              |                   |                   |                   |
| P, % MS                | 0.31              |                   |                   |                   |
| Lecitina de Soya, % MS |                   |                   |                   | 1.00 <sup>2</sup> |
| Met, % MS              | 0.31              | 0.58              | 45.3              |                   |
| Lys, % de MS           | 0.95              | 1.09              |                   | 37.7              |

<sup>1,2</sup> Valores de referencia reportados por la casa comercial, <sup>3</sup>Estimado utilizando el modelo sumativo desarrollado por Weiss et al. (1992), MetP: Metionina protegida ruminalmente (Mepron), LysP: Lisina protegida ruminalmente (AjiPro-L), MS: Materia seca, PC: Proteína cruda, TDN: Total de nutrientes digestibles, EE: extracto etéreo, FDN: Fibra en detergente neutro, FDA: Fibra en detergente ácido, LDA: Lignina en detergente ácido, CNE: Carbohidratos no estructurales = 100 – (%FDN + % PC + % EE + % Cenizas), <sup>5</sup>ENL: Energía neta de lactancia (Mcal/kg) = 0.0245 \*NDT (%) – 0.12, Met: Metionina, Lys: Lisina.

### ***Estimación de los balances de Met y Lys***

Para poder llevar a cabo las determinaciones del balance de Met y Lys para cada uno de los animales y determinar las cantidades diarias de Met y Lys a suplementar fue realizada una simulación, generándose en primer término la estimación de los requerimientos de Met y Lys teniendo en cuenta el nivel de producción de leche, el peso vivo del animal, la producción de grasa y proteína de la leche y la cantidad de AA que llega al ID. Para esta última estimación se utilizó la cantidad de proteína metabolizable generada la cual incluye a la proteína no degradable en rumen (PNDR), la proteína microbiana (PMicrob) y la proteína endógena (PE).

#### *Cálculo de los requerimientos*

Los requerimientos de Met y Lys para cada animal fueron estimados a través del programa Aminocow (AC) Dairy Ration evaluator, versión 3.5.2 (Evonik Industries; <http://www.makemilknotmanure.com/aminocow.php>). Dicho programa se basa en un enfoque factorial para establecer dichos requerimientos a partir de los requerimientos de mantenimiento, producción de leche y crecimiento corporal. El crecimiento corporal es calculado cuando el animal presenta menos de 48 meses de edad y su tamaño corporal es menor al ideal. En el caso específico de la finca utilizada, el peso maduro fue establecido en 580 Kg determinado con los animales del establecimiento que tenían entre 3 y 6 partos. Los parámetros utilizados para cada animal incluyeron el peso vivo (PV), los días en leche, la edad, la producción de leche y el porcentaje de proteína previamente obtenidos en el hato lechero para cada uno de los animales que fueron incluidos en la experimentación.

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de los requerimientos de Met y Lys se presentan en la Tabla 2 (Aminocow, 2010).

Tabla 2. Ecuaciones utilizadas para la estimación de los requerimientos de Met y Lys en vacas lactantes (Aminocow, 2010)

| Met  | Lys  |
|--|--|
| METmant = 0.0272 * (PV <sup>0.75</sup> )             | LYSmant = 0.0932 * (PV <sup>0.75</sup> )                   |
| METleche = Pdn leche * % PC proteína leche * 0.38572 | LYSleche = Pdn leche * % CP proteína de la leche * 1.16072 |
| METgan = Factor de ganancia * 13.3                   | LYSgan = Factor de ganancia * 46                           |
| <b>METreq = METmant + METleche + METgan</b>          | <b>LYSreq = LYSmant + LYSleche + LYSgan</b>                |

Factor de ganancia de peso = PV maduro - PV vaca/365 - días en leche

PV maduro = 580 Kg

METmant: Requerimientos de Metionina para mantenimiento, METleche: Requerimientos de metionina para producción de leche, METgan: Requerimientos de metionina para crecimiento, METreq: Requerimiento total de metionina, LYSmant: Requerimientos de lisina para mantenimiento, LYSleche: Requerimientos de lisina para producción de leche, LYSgan: Requerimientos de lisina para crecimiento, LYSreq: Requerimiento total de lisina.

#### *Cálculo del aporte de PM y AA metabolizables (AAM)*

Los aportes de PM y AAM fueron estimados para cada uno de los animales experimentales a partir de la sumatoria de las fracciones PNDR, PMicrob y PE. Para calcular el aporte de cada una de las fracciones citadas antes de iniciar el experimento, fue necesario estimar los siguientes parámetros: a) el CMS promedio por animal/día, el cual fue estimado mediante el método de la diferencia entre el aforo de entrada y salida de los animales a la franja de pastoreo, siendo su valor de 13 Kg MS/vaca/día, b) la cantidad de PNDR de cada uno de los alimentos y el TDN de los alimentos utilizados en la ración.

$$PM, g = PNDR + PMicrob + PE$$

$$AAM, g = AANDR + AAMicrob + AAEnd$$

Dónde:

PNDR ó AANDR: Proteína ó AA no degradable en rumen

PMicrob ó AAMicrob: Proteína ó AA de origen microbiano

PE ó AAEnd: proteína ó AA de origen endógeno

Las fórmulas para los cálculos de las diferentes fuentes de la PM fueron las siguientes:

*Proteína no degradable en rumen (PNDR) y aminoácidos no degradables en rumen (AANDR).* Este aporte fue calculado con base en la degradabilidad ruminal *in situ* y digestibilidad intestinal del pasto Kikuyo, concentrado y las fuentes de AAP.

$$\text{PNDR, g} = \text{CMS alimento (g)} * \% \text{ PC del alimento} * \% \text{ PNDR del alimento} * \% \text{ DI PC}$$

$$\text{AANDR, g} = \text{CMS alimento (g)} * \% \text{ MSNDR} * \% \text{ AA} * \text{AA DI}$$

Dónde:

AANDR: Aminoácido no degradable en rumen

AA DI: Digestibilidad intestinal del aminoácido

*Proteína microbiana (PMicrob) y AA procedentes de la PMicrob.* El aporte de PMicrob fue calculado por la fórmula del NRC (2001) para cada uno de los animales experimentales la cual requiere los datos del total de nutrientes digestibles de los alimentos y el consumo de estos para su estimación.

$$\text{PMicrob, g/d} = (0.13 * \text{TDN consumido del kikuyo (Kg)}) * 1000$$

$$\text{TDN consumido} = \text{Kg MS consumido de forraje o concentrado} * \% \text{ TDN}$$

Los valores de TDN para el suplemento y el forraje fueron 76 y 60.4 % respectivamente.

$$\text{AAMicrob, g/d} = \text{PMicrob} * \% \text{ AA} * 0.6 * 0.8$$

Dónde:

AAMicrob: Aminoácido procedente de la PMicrob



0.6 y 0.8: 60% de la síntesis de proteína microbiana es asumida como proteína verdadera y 80% es la digestibilidad de la proteína microbiana respectivamente.

Proteína endógena (PE) y aminoácidos endógenos (AAEnd). El aporte de esta fracción es determinada con base en la cantidad de MS consumida total, como es mostrada en la siguiente fórmula:

$$PE, \text{g/d} = 11.87 \text{ g/Kg} * \text{CMS (Kg)del alimento}$$

$$EMet, \text{g/d} = 0.11 \text{ g/Kg} * \text{CMS (Kg)del alimento} * 0.8$$

$$ELys, \text{g/d} = 0.40 \text{ g/Kg} * \text{CMS (Kg)del alimento} * 0.8$$

Dónde:

EMet: Metionina metabolizable desde la PE

ELys: Lisina metabolizable desde la PE

0.8: Coeficiente de digestibilidad de los aminoácidos procedentes de la PE

El promedio de las estimaciones de los balances de la Lys y Met, la composición química de las dietas y los consumos estimados inicialmente de cada uno de sus componentes (CMSf, CMSc, CMSt), así como los consumos de PC, PDR, PNDR, Met, Lys y las deficiencias de estos dos aminoácidos en la dieta son presentados para cada uno de los tratamientos en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de la dieta, consumo estimado y balance de AA proyectados

| Item                         | Tratamientos |        |
|------------------------------|--------------|--------|
|                              | Control      | MetLys |
| <b>Variables de la dieta</b> |              |        |
| PC (% del CMSt)              | 17.8         | 18.4   |
| FDN (% del CMSt)             | 43.6         | 43.6   |
| EE (% del CMSt)              | 3.4          | 3.8    |
| TDN (% del CMSt)             | 65.5         | 66.5   |
| ENL (Mcal/Kg de CMS)         | 1.49         | 1.52   |

**Variables de consumo**

|             |      |      |
|-------------|------|------|
| CMSf (Kg/d) | 13   | 13   |
| CMSc (Kg/d) | 7.68 | 7.53 |
| CMSt (Kg/d) | 20.7 | 20.8 |

**Variables de consumo estimadas**

|                       |      |      |
|-----------------------|------|------|
| CPC total (g, %MS)    | 3560 | 3471 |
| CPDR total (g, %MS)   | 2384 | 2315 |
| CPNDR total (g, % MS) | 1176 | 1160 |

**Variables metabolizables predichas por el modelo**

|                          |        |       |
|--------------------------|--------|-------|
| PM (g/d)                 | 1712   | 1707  |
| Deficiencia de Met (g/d) | -7.38  | -6.91 |
| Met (% PM)               | 1.34   | 1.35  |
| Deficiencia de Lys (g/d) | -26.37 | -23.9 |
| Lys (% PM)               | 4.67   | 4.69  |

CMSf: Consumo de MS del forraje = aforo entrada – aforo de salida, CMSc: Consumo de materia seca del concentrado = Oferta (Kg) – Rechazo (Kg), CMSt: Consumo de MS total = CMSf + CMSc, PC: Proteína cruda, FDN: Fibra en detergente neutro, EE: Extracto etéreo, TDN: Total de nutrientes digestibles, ENL: Energía neta de lactancia. Cada fracción química para el tratamiento control fue calculada como: (Kg de la fracción química aportada por cada una de las fuentes - forraje, concentrado / CMSt)\*100 y para el grupo MetLys como: (Kg de la fracción química aportada por cada una de las fuentes - forraje, concentrado, MetP, LysP / Kg de CMSt) \*100. CPC total: Consumo de proteína cruda total = CMSf (kg) \* % PC del forraje + CMSc (Kg) \* % PC del concentrado, CPDR total: Consumo de proteína no degradable en rumen = CMSf (Kg) \* % PDRforraje + CMSc (Kg)\* % PDRconcentrado, CPNDR total: Consumo de proteína no degradable en rumen total = CMSf (Kg) \* % PNDRforraje + CMSc (Kg) \* % PNDRconcentrado, PM: Proteína metabolizable = PMicrob + PNDR + PE, Met (%PM): Met como porcentaje de la PM = g de Met metabolizable/ g de PM, Lys (%PM): Lys como porcentaje de la PM = g de Lys metabolizable/ g de PM. Para los valores estimados en esta tabla en cada uno de los grupos experimentales, fue considerado los consumo de forraje (promedio estimado) y el alimento concentrado para cada uno de los animales que fueron incluidos dentro de cada tratamiento.

**Tratamientos**

Los tratamientos utilizados en este estudio fueron dos, el tratamiento Control (Control): Pasto kikuyo + suplemento comercial sin aminoácidos protegidos (AAP) y el tratamiento MetLys: Pasto kikuyo + suplemento comercial + suplementación con, LysP y MetP. La cantidad de AA suministrados surgió de los resultados de las

deficiencias de la dieta en el programa AminoCow® Version 3.5.2 como se mostró anteriormente (ver Tabla 3). Los AAP usados en este experimento, fueron AjiPro™-L, un producto de lisina protegida manufacturado por la compañía Ajinomoto (Tokyo, Japón), el cual es una matriz compuesta de mínimo 50% de Lys (L-lisina monohidrocloruro HCl), 49% de ácidos grasos protegidos ruminalmente sensibles al pH intestinal y 1% de lecitina de soya (<http://www.ajipro-l.info/>). La metionina protegida (Mepron®) fue manufacturada por la Industria Evonik (Degussa AG, Alemania) conteniendo 85% de metionina, 3% de fibra cruda y 1% de extracto etéreo (<http://feed-additives.evonik.com>).

La adición al alimento concentrado de Lys y Met protegidas en el grupo MetLys (75 g de MetP y 190 g de LysP), fueron calculadas para liberar y absorber en promedio 7.0 y 24.0 g de Met y Lys/vaca/d al intestino delgado de las vacas Holstein mediante la siguiente ecuación:

$$\text{AAP liberado y absorbido en el ID, g} = (\text{g de AA ingerido desde la fuente protegida} - \text{g del AADR desde la fuente protegida}) * \% \text{ DI AAP}$$

Dónde:

AANDR: Aminoácido no degradable en el rumen

DI AAP: Digestibilidad intestinal del AA en la fuente protegida

### ***Colecta de muestras, preparación y métodos analíticos***

*Estimación del consumo de materia seca (CMS) y composición química de la dieta de vacas lecheras.*

El consumo de materia seca del forraje fue determinado mediante la utilización de óxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como marcador externo para estimar el volumen de heces producidas y LDA como marcador interno. El óxido de cromo fue suministrado vía oral en dosis de 5 g, dos veces al día (en el ordeño de la mañana y de la tarde). El procedimiento fue realizado durante 9 días, que comenzaron

desde el día 12 hasta el día 20 después de iniciado el período experimental. Los primeros 6 días de dosificación fueron utilizados para alcanzar el equilibrio de la ingestión y la excreción del marcador y, a partir del séptimo día de suministro del indicador y durante 3 días adicionales fueron colectadas muestras de 250 gramos de heces 2 veces al día en el ordeño de la mañana y tarde de manera manual directamente desde el recto. Las muestras de heces fueron congeladas hasta el final del experimento y fueron mezcladas, obteniéndose una sola muestra final (pool) por cada vaca. Las muestras fueron secadas a 60°C por 72 horas y fueron conservadas hasta los análisis de LDA y concentración de óxido de cromo (Riquelme y Pulido 2008) por espectrofotometría de absorción atómica (Williams et al 1962).

El consumo de MS del forraje (CMSf) fue estimado utilizando la producción fecal (PF) y la LDA, de la siguiente manera:

$$PF \text{ (g MS/vaca/día)} = \frac{\text{Cromo administrado, g/d}}{\text{Concentración de cromo en las heces, g/g de MS}}$$

Dónde:

PF = Producción fecal, g de MS/día

El consumo de MS del forraje (CMSf) fue estimado en base a la fórmula publicada por Ferret et al. (1999) y Correa et al. (2009) como se muestra a continuación:

$$CMSf \text{ (Kg/vaca/día)} = \frac{(\text{LDA heces} * PF) - (\text{LDAc} * \text{CMSc})}{\text{LDAf}}$$

Dónde:

CMSf = Consumo de MS del forraje, Kg/vaca/día

PF = Producción total de heces, Kg de MS/día

LDA heces = Lignina en detergente ácido encontrado en las heces del animal, %

LDAc = Lignina en detergente ácido del concentrado, %

CMSc = Consumo de MS del concentrado, Kg/vaca/día

LDAf = Lignina en detergente ácido del forraje, %

Fue asumida una tasa de recuperación de cromo en las heces de 80% (Correa et al 2009). El CMS del concentrado (CMSc) y el suministro de AA protegidos (CMSMet y CMSLys) fueron cuantificados mediante pesaje (oferta-rechazo) una vez el animal llegaba a la sala de ordeño. El consumo de MS total (CMSt) para ambos grupos experimentales fue calculado de la siguiente manera:

Consumo de MS total para el grupo control (CMt, Kg MS/d) = CMSf + CMSc

Consumo de MS total para el grupo MetLys (CMSt, Kg MS/d) = CMSf + CMSc +  
CMSMet + CMSLys

Para determinar la calidad composicional de la pastura y del suplemento se tomaron dos muestras cada semana durante todo el período experimental (día 1 hasta el día 20 de ensayo). La composición final de la pastura y del suplemento fue estimada a partir de la obtención del pool de las muestras colectadas. Las muestras de forraje y suplemento fueron secadas a 65 °C en una estufa de ventilación forzada durante 48 horas y pesadas para determinar el contenido de MS parcial antes de realizarse el análisis químico. Posteriormente, las muestras fueron molidas a 1 mm en un modelo Willey Mill (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) y analizadas para determinar sus concentraciones de MS, Proteína cruda (PC) de acuerdo a los métodos 934.01 y 976.05 del AOAC (AOAC, 2002), extracto etéreo (EE), de acuerdo a la metodología de la AOAC (1995). Finalmente, fue determinada la fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácida (FDA) y lignina en detergente ácido (LDA) utilizando esta última como marcador interno para estimar el CMSf de la dieta por la metodología descrita por Van Soest et al (1991) y AOAC, método 973.18 procedimiento C y D (1990) (Ver Tabla 1).

#### *Determinación de la proteína microbiana (PMicrob)*

Muestras de orina fueron obtenidas de los 12 animales y fueron colectadas según la metodología propuesta por Chen y Gomes (1995) durante los días 18, 19 y 20

del período experimental. Las muestras se colectaron en la mañana y tarde después del ordeño mediante “la estimulación del clítoris de cada vaca”. Después la muestra de orina fue filtrada y 5 ml de orina fueron tomados para ser diluídos inmediatamente en 45 ml de ácido sulfúrico a 0.036 N con el fin de evitar la destrucción bacteriana de los derivados púricos y la precipitación del ácido úrico. Las muestras fueron inmediatamente almacenadas a -20°C y analizadas para creatinina, alantoina y ácido úrico (Oliveira et al., 2001). La creatinina y ácido úrico fueron determinadas usando el método colorimétrico conforme con la técnica de Fujihara et al (1987) y la alantoina fue medida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como fue descrito por Chen y Gomes (1995) y Vlassa et al (2009) en el laboratorio de análisis instrumental (Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia). Finalmente fueron calculados los volúmenes urinarios y la producción de proteína microbiana de cada vaca mediante las siguientes fórmulas matemáticas:

La concentración de derivados de purina (DP) en las muestras de orina (mmol/L) se obtuvo a través de la suma de la concentración de alantoina (mmol/L) y ácido úrico (mmol/L).

$$DP \text{ (mmol/L)} = \text{Alantoina (mmol/L)} + \text{Ácido úrico (mmol/L)}$$

La cuantificación de la excreción diaria de derivados de purina (DPE) fue obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$DPE = \frac{((DP * (PV * Kct))}{113.12 * C}$$

Dónde:

DPE: Excreción diaria de derivados de purina (mmol/d)

DP: Concentración de los derivados de purina en la muestra de orina (mmol/L)

PV: Peso vivo (Kg)

C: Concentración de creatinina en las muestras de orina (mmol/L)

Kct: Coeficiente de excreción diario de creatinina (mg/d) =  $113 * PV^{-0.25}$ , valor propuesto por Ørskov y Macleod (1982) y Chen et al (1992).

La estimación de la absorción diaria de purinas (AP) proveniente de los ácidos nucleicos microbianos fue calculada según Chen y Gomes (1995):

$$PA \text{ (mmol/d)} = \frac{((DPE - (0.385 * PV^{0.75})))}{0.85}$$

Dónde:

PA: Purinas absorbidas por día (mmol/d)

DPE: Excreción diaria de derivados de purina (mmol/d)

$0.385 * PV^{0.75}$ : Aporte endógeno de derivados de purina (mmol/Kg de PV metabólico)

0.85: Recuperación de purinas absorbidas como derivados de purinas (Verbic et al., 1990).

El flujo intestinal de los compuestos nitrogenados microbianos (NM, g N/día) fue calculado a partir de las purinas microbianas absorbidas (PA, mmol/d) utilizándose la ecuación:

$$NM = \frac{(PA * 70)}{(0.83 * 0.116 * 1000)}$$

Dónde:

NM: N microbiano (g/d)

PA: Purinas absorbidas (mmol/d)

70: El contenido de N en las purinas microbianas (mg N/mmol)

0.83: Digestibilidad de las purinas

0.116: tasa de N de las purinas (N total en los microorganismos ruminales, expresado por la razón 11.6/100)

1000: Factor de corrección de mg a gramos (Chen y Gomes, 1995).

### ***Producción y composición de la leche***

La producción y composición de la leche fueron registradas a partir de los dos ordeños de cada una de las vacas experimentales al día 20 después de iniciado el experimento. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Leches (Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia). Los contenidos (g/100g) de grasa, proteína, sólidos totales, sólidos no grasos (SNG), lactosa, nitrógeno ureico en leche (MUN) y betahidroxibutirato (BHB) fueron determinados usando el MilkoScan (MilkoScan™ FT+ from Foss).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando un modelo mixto considerando el animal como efecto aleatorio y los tratamientos como efecto fijo mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS (2001). La producción de leche al inicio del experimento, los días en lactancia y la CC fueron introducidas en el modelo como covariables. Las variables analizadas fueron CMS, proteína metabolizable (PM) que incluyó la PNDR, PMicrob y PE digestibles, requerimiento de Met (METReq), requerimiento de Lys (LYSReq), suministro de Met (Aporte de Met), suministro de Lys (Aporte de Lys), balance de Met (BMET), balance de Lys (BLYS), relación Met:Lys y producción y composición de la leche. Se realizó la comparación de medias con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el procedimiento LSMEANS de SAS (2001).

### **Resultados**

En la tabla 4, se muestra la composición química de la dieta y los valores de consumo de la dieta, PC, PDR, PNDR, Met y Lys para cada uno de los grupos experimentales.



Tabla 4. Composición química de la ración consumida (forraje y concentrado) y efecto de la suplementación de Met y Lys protegidas sobre el consumo de MS del forraje (CMSf), concentrado (CMSc), metionina protegida (CMet), lisina protegida (CLys) y total (CMSt) de vacas lactantes

| Variable  | Control | MetLys           | EEM  | P      |
|---|---------|------------------|------|--------|
| <b>Composición química de la dieta</b>                  |         |                  |      |        |
| PC (% del CMSt)   | 17.8b   | 18.4a            | 0.07 | <0.001 |
| FDN (% del CMSt)  | 42.7    | 42.3             | 1.80 | 0.66   |
| EE (% del CMSt)   | 3.43b   | 3.83a            | 0.07 | 0.004  |
| TDN (% del CMSt)  | 66.5    | 67.3             | 1.86 | 0.39   |
| ENL (Mcal/Kg de CMS)                                    | 1.49    | 1.50             | 0.02 | 0.60   |
| <b>Consumos de materia seca</b>                         |         |                  |      |        |
| CMSf (Kg MS/d)  | 11.5    | 11.9             | 2.67 | 0.58   |
| CMSc (Kg MS/d)  | 7.58    | 7.56             | 0.57 | 0.97   |
| CMStotal (Kg MS/d)                                      | 19.1    | 19.6             | 1.30 | 0.69   |
| <b>Consumos y aportes de proteína de la dieta total</b> |         |                  |      |        |
| CPC total (g MS/d)                                      | 3476    | 3525             | 233  | 0.84   |
| CPDR total (g MS/d)                                     | 2351    | 2325             | 152  | 0.87   |
| CPNDR total (g MS/d)                                    | 1126    | 1200             | 82.5 | 0.41   |
| <b>Aportes de AA</b>                                    |         |                  |      |        |
| CMSMet (g MS/d)   | 79.7b   | 165 <sup>a</sup> | 7.47 | 0.006  |
| CMSLys (g MS/d)   | 193b    | 264 <sup>a</sup> | 15.6 | 0.006  |

a, b Medias en la misma fila con letras diferentes difieren estadísticamente entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), PC: Proteína cruda, FDN: Fibra en detergente neutro, EE: Extracto etéreo, TDN: Total de nutrientes digestibles, ENL: Energía neta de lactancia. Cada fracción química para el tratamiento control fue calculada como: (Kg de la fracción química aportada por cada una de las fuentes - forraje, concentrado / CMSt)\*100 y para el grupo MetLys como: (Kg de la fracción química aportada por cada una de las fuentes - forraje, concentrado, MetP, LysP / Kg de CMSt) \*100, CMSf (Kg/d): Consumo de MS del forraje, CMSc (Kg/d): Consumo de MS del concentrado, CMSt (Kg/d): Consumo de MS total, CPC total (g/d): Consumo de proteína cruda total = (CMS del forraje en Kg \* % PC forraje\*1000) + (CMS del concentrado \* %PC concentrado\*1000), para el grupo MetLys se adicionaron los aportes de las fuentes de Met y Lys protegidas, CPDR (g/d): Consumo de proteína degradable en rumen= (CPC total del forraje \* % PDR del forraje) + (CPC total del concentrado \* % PDR del concentrado), para el grupo MetLys se adicionaron los aportes de las fuentes de Met y Lys protegidas, CPNDR (g/d): Consumo de proteína no degradable en rumen = CPC total del alimento – CPDR del alimento, CMSMet o CMSLys (g/d): Consumo de Met o Lys = Consumo de MS del alimento en Kg \* % AA en el alimento (como % MS) \* 1000,

La composición química estimada difirió entre tratamientos en su contenido de PC y EE ( $p < 0.05$ ). La suplementación con MetP y LysP no afectó significativamente el CMS total del forraje y del concentrado (Tabla 4). Los consumos de PC total, PDR, PNDR fueron similares entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) mientras que el CMS de la Met y Lys fueron estadísticamente diferentes entre los grupos experimentales.

El efecto de la suplementación con AAP sobre la síntesis de proteína microbiana y el balance aminoácido estimado se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto de la suplementación con AA protegidos sobre la proteína metabolizable (PM) y el balance intestinal de Lys y Met calculados acorde con el programa Aminocow

| Variable                                      | Control | MetLys  | EEM  | P     |
|---|---------|---------|------|-------|
| <b>Fuentes de proteína metabolizable (PM)</b> |         |         |      |       |
| PNDR digestible (g/d)                         | 646     | 672     | 47.3 | 0.59  |
| PMicrob digestible (g/d)                      | 953b    | 1089a   | 51.6 | 0.05  |
| PE digestible (g/d)                           | 186     | 181     | 12.4 | 0.69  |
| PM (g/d)                                      | 1772 b  | 1972 a  | 71.1 | 0.03  |
| <b>Balance de AA (AA metabolizables)</b>      |         |         |      |       |
| MET   |         |         |      |       |
| MET Req (g/d)                                 | 33.6    | 31.2    | 3.93 | 0.15  |
| Aporte MET (g/d)                              | 27.6b   | 36.9a   | 2.60 | 0.02  |
| BMET (g/d)                                    | -5.11b  | 4.24a   | 2.94 | 0.02  |
| MET (% PM)                                    | 1.53    | 1.87    | 0.09 | 0.01  |
| LYS   |         |         |      |       |
| LYS Req (g/d)                                 | 104     | 102     | 10.5 | 0.13  |
| Aporte LYS (g/d)                              | 89.1b   | 120.1a  | 8.38 | 0.009 |
| BLYS (g/d)                                    | -14.8b  | 18.4a   | 9.81 | 0.02  |
| LYSMet (% PM)                                 | 4.84    | 6.19    | 0.24 | 0.002 |
| Relación Met:Lys                              | 1: 3.17 | 1: 3.21 | 0.19 | 0.84  |

a, b Medias en la misma fila con letras diferentes difieren estadísticamente entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), PNDR digestible (g/d): consumo de proteína no degradable en rumen absorbable = CPNDR del alimento (g) \* % DIPC (%PNDR), % DIPC (%PNDR): Digestibilidad intestinal de la PC como porcentaje de la PNDR, PMicrob digestible (g/d): Flujo de proteína microbiana absorbable determinada por derivados púricos y creatinina, PE digestible (g/d): Proteína endógena digestible (g/d) = CMSt en Kg \* 11.87 g/Kg \* 0.8, PM (g/d): Proteína metabolizable = PNDR digestible + PMicrob digestible + PE digestible, METReq y LYSReq (g/d): Requerimientos de Met y Lys, Aporte de Met y Lys: gramos de Met y Lys que llegan al ID y son digestibles = (Aporte AA desde la PNDR \* % DI AA en la PNDR) + (Aporte del AA desde la PMicrob \* % DI AA en la PMicrob) + (Aporte del AA desde PE \* % DI AA en la PE), BMET y BLYS (Balance de Met y Lys) = (Aporte del AA – Requerimiento del AA), Met:Lys: Relación entre Met y Lys que llegan al ID = Aporte de Lys \* (Aporte de Met)<sup>-1</sup>. Todos los cálculos de las variables presentadas en la tabla fueron realizados tomando los consumos de MS y los valores de proteína o Met y Lys del forraje, del suplemento y de los AA protegidos para el caso del grupo MetLys.

No se detectaron efectos significativos en PNDR y PE entre el grupo control y MetLys ( $p > 0.05$ ). La suplementación con Met y Lys protegidas tuvo efectos positivos sobre la cantidad de PMicrob digestible y PM, así como también sobre los aportes y balances de MET y LYS ( $p < 0.05$ ).

Las respuestas en la producción y composición de la leche a la suplementación de AA protegidos son presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas en la producción y composición de leche en vacas Holstein

| Variable                   | Control | MetLys | EE   | p    |
|----------------------------|---------|--------|------|------|
| Producción de leche (Kg/d) | 23.7    | 23.8   | 2.05 | 0.96 |
| 4% LCG <sup>2</sup> (Kg/d) | 24.2    | 26.0   | 3.42 | 0.10 |
| Proteína (g/Kg)            | 30.4    | 31.1   | 0.69 | 0.16 |
| Grasa (g/Kg)               | 33.2    | 36.9   | 3.75 | 0.36 |
| Lactosa (g/Kg)             | 45.9    | 47.4   | 0.69 | 0.08 |
| SNG (g/Kg)                 | 83.8    | 85.9   | 1.71 | 0.28 |
| ST (g/Kg)                  | 117     | 122    | 3.62 | 0.17 |
| MUN (mg/dL)                | 21.2    | 22.8   | 1.52 | 0.31 |
| BHB (mM)                   | 0.25    | 0.24   | 0.06 | 0.81 |

a, b Medias en la misma fila con letras diferentes difieren estadísticamente entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), <sup>2</sup>4% LCG: Leche corregida por grasa = (0.4 \* producción de leche) + (15 \* producción de

grasa), ST: Sólidos totales, SNG: Sólidos no grasos, MUN: Nitrógeno ureico en leche, BHB: Betahidroxibutirato.

El aporte de MetLysP no tuvo efecto sobre la producción de leche, leche corregida al 4% de grasa, proteína, grasa, SNG, lactosa, ST, MUN y BHB los que resultaron similares entre tratamientos ( $p>0.05$ ).

## **Discusión**

La dieta con MetLys presentó mayores contenidos de PC y EE (ver tabla 4) que la ración control por cantidades adicionales de Met y Lys suplementadas. Sin embargo, los mayores aportes que contribuyeron a incrementar estas dos variables fueron realizadas principalmente por la cantidad de LysP adicionada a la dieta y en menor proporción por la MetP, debido principalmente a que la Lys fue el AA que tuvo una mayor inclusión (190 g de LysP vs. 75 g de MetP). Los datos también sugieren que el EE no fue disponible para ser utilizado por el animal debido a la baja degradabilidad ruminal de la MS (6.73%) y digestibilidad intestinal (31.1%) de esta fuente (cuadro 2, capítulo 3). En el presente trabajo, la mayor inclusión de los AAP tuvo como objetivo suplir las deficiencias generadas por los alimentos constitutivos de la ración. En efecto, en diferentes estudios (Robinson, 2010) la cantidad suplementada del AA suele ser más baja que la cantidad aquí adicionada lo que puede explicarse por una sobreestimación de la verdadera protección del compuesto (85%) informada por el fabricante, la cual no siempre resulta verdadera o similar para todos los sistemas de alimentación. En este trabajo, para definir la cantidad suplementada se tomó en cuenta tanto el porcentaje del AA presente en la fuente como la proporción del mismo estimada como no degradable en el rumen (AANDR) pero digestible en el intestino, lo que explica el mayor nivel de inclusión.

De acuerdo a lo esperado, los consumos de Met y Lys (CMet y CLys) resultaron mayores ( $p<0.05$ ) en el grupo MetLys (Tabla 4) representando tan sólo el 0.37 y 0.94 % respectivamente del total de la MS consumida. El CMSt no difirió entre

tratamientos debido al similar consumo de forraje y concentrado de las vacas ( $p > 0.05$ ).

El incremento en la producción de PM ante la suplementación con Lys y Met (Tabla 5) podría atribuirse al incremento en las fuentes de esta y por lo tanto resulta importante cuantificarlas y evaluar su comportamiento digestivo. Como puede observarse, la PMicrob digestible fue significativamente diferente entre tratamientos (Tabla 5). Si bien la PNDR no difirió, se observó una diferencia numérica a favor del tratamiento MetLys. Es importante destacar que los cálculos para estimar el aporte del total de PM son un efecto aditivo desde la PNDR, PMicrob y PE.

El incremento en la cantidad estimada de PMicrob producida en el grupo MetLys, es un resultado difícil de explicar. Otros autores como Berthiaume et al (2000), encontraron que el flujo de N bacteriale incrementó significativamente cuando la MetP fue incubada en el rumen resultado que tampoco pudo ser satisfactoriamente explicado por los autores. Una de las hipótesis capaces de explicar este efecto estimulador sería que la fuente utilizada de MetP presentó una alta degradabilidad ruminal de la MS (60.2 %) a las 27.4 h de incubación (Tabla 1) aportando un AA que es degradado más lentamente en el tiempo debido a su protección. Esto permite hipotetizar una situación de mejor sincronía con la fermentación de carbohidratos estructurales como celulosa y hemicelulosa, los cuales inician solamente su degradación desde las 3–4 horas hasta las 96 horas pos-alimentación (Iskenderov y Mamedova 2013) mejorando de esta manera el crecimiento microbiano. Esta hipótesis es consistente con un trabajo *in vitro* previo (Duque *et al.* no publicado) en el que fueron evaluadas estas fuentes protegidas comparadas con su homólogas sin protección. Los resultados indicaron una menor degradación de la MS en el tratamiento con MetP cuando esta fue comparada con Met sin protección ( $p < 0.05$ ) en los horarios 2, 4, 8, 12, 24 y 30 h pos-incubación (10.8, 12.2, 15.0, 19.3, 29.1 y 43.9%).

Efectos adicionales de la Met sobre la población de microorganismos, producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y rutas metabólicas en el rumen han sido

también informados. Lundquist et al (1985) encontraron que la suplementación de vacas con 0.15% de DL-Met como porcentaje de la MS de la dieta presentaron una mayor población de protozoos con incrementos en las concentraciones de isobutirato y butirato en el fluido ruminal respecto a las vacas control. Estos resultados sugieren que ciertos microorganismos pueden ser beneficiados por el suministro de Met en el rumen y favoreciendo la producción de AGV capaces de mejorar la producción de PMicrob.

En otro de los estudios, Salsbury et al (1971) reportan que el consumo de Met puede ser beneficioso en el rumen debido a la multiplicidad de reacciones bioquímicas que utilizan la dicho AA. El trabajo (*in vitro*) estableció además que la digestión de la celulosa resultó mayor en un tratamiento con celulosa + L-metionina respecto a la celulosa sola. Adicionalmente, y utilizando Met radioactiva indicándolos autores reportaron que la adición de L-metionina o su análogo mejoran la formación de metionina sulfóxido (importante compuesto fuente de dimetil sulfuro o metanotiol el que a su vez puede prevenir parcialmente la inhibición de la digestión de la celulosa por la etionina), la descarboxilación, detiometilación (debido a que la Met compite efectivamente por el sitio activo ocupado por la etionina, el cual es un antimetabolito). Esto incrementa la relación metabolito/antimetabolito previniendo la inibición que ejerce la etionina y la síntesis de proteína microbiana.

Como puede observarse en la Tabla 5, el balance de Met y Lys (METB y LYSB) resultó más adecuado para el grupo de vacas suplementadas con AA protegidos, debido fundamentalmente a la mayor cantidad de PMicrob producida, como ya fue comentado.

Algunos de los animales experimentales presentaron un balance de Lys y Met positivo incluso sin la suplementación con AAP. En consecuencia, el aporte adicional de AAP produjo en algunos casos un balance mayor a lo esperado lo que podría explicar en parte la falta de consistencia en la respuesta al aporte de AAP en términos de producción de leche y de proteína con casos positivos y

nulos, debido a balances variables de AA entre animales que estuvieron por debajo o por encima de sus verdaderos requerimientos.

Por otra parte, la falta de efectos consistentes sobre la respuesta productiva también podría ser en parte explicada por el exceso de PC que se le suministra a las vacas lecheras. Una vaca Holstein produciendo 3.5% de grasa y 3.0% de proteína y una producción de 25 L/día debería consumir 2870 g/día de PC y 1937 g/día de PDR (NRC, 2001) pero tanto en animales control como en los suplementados con AAP, la cantidad de PC aportada fue de 3476 y 3525 g/día y de PDR fue 2351 y 2325 g/d respectivamente, lo que genera una sobrecarga hepática en el animal, debido a un exceso de PDR de 414 y 388 g/día. Estos mayores niveles en el animal de PDR y posiblemente de amonio generan un mayor gasto energético y un mayor uso de aminoácidos para eliminar este exceso a través de la producción de urea (Overton et al., 1998; Harris 2003). También, la falta de efectos a los AAP podría ser debida a una sobreestimación de las deficiencias de Met y Lys por el modelo usado para hacer las predicciones, debido a que los aportes predichos (ver tabla 3) fueron menores a los obtenidos en este experimento (ver tabla 5). Para animales en el segundo tercio de la lactancia y con un promedio de producción de 24 litros de leche/día, los desbalances de AA no fueron tan pronunciados para algunos de los animales usados en la experimentación.

En las condiciones del presente experimento, parecería razonable diseñar estrategias de alimentación tendientes a incrementar el aporte de AA a través de una mayor producción de proteína microbiana ya que como fue estimado para el tratamiento MetLys, una mayor producción de PMicrob implicó un mejor balance de dichos AA. Otra alternativa interesante que merece ser evaluada sería suplementar con AA sin protección para comprobar si se obtiene la misma que con la utilización de los AA protegidos a un menor costo.

El NRC (2001) y algunos autores (Rulquin et al 1993; Nan et al 2014) han postulado que la relación óptima entre la Met y la Lys sería de 3:1 y que un balance de 7.2% de Lys y 2.5% de Met expresados como porcentajes de la

proteína metabolizable favorecería la síntesis de proteína en leche. En las condiciones del presente trabajo pudo estimarse que el aporte suplementario de AA protegidos mejoró la disponibilidad de METMet y LYSMet, sin alcanzar los valores óptimos teóricos establecidos (ver Tabla 5).

Cabe destacar también que la relación Met:Lys presentó valores superiores a 3:1 en ambos tratamientos lo que se estuvo por encima de las recomendaciones del NRC (2001). Resulta por lo tanto aconsejable caracterizar la ración y estimar la relación de Met/Lys para equilibrar dicha relación como paso previo a un aporte dietario de AA para satisfacer los requerimientos individuales. Esta conclusión se basa en que aunque los animales tuvieron diferentes CMS y suministro de AA al ID, cuando se analizó la relación Met/Lys los valores resultaron muy similares entre tratamientos y los coeficientes de variación mucho más bajos (6.7 y 8.2% para METmet y LYSMet respectivamente) que si se trata de balancear directamente por la cantidad de AA aportados para alcanzar los requerimientos de cada uno de los animales. Este razonamiento resulta comparable al realizado por otros autores (Rulquin et al. 1993; Doepel et al. 2004) cuando incrementan los aportes de AA a fines de alcanzar el 2.5 y 7.2 % de la Met y Lys como porcentaje de la PM para mejorar la síntesis de proteína láctea. Sin embargo, en diversas condiciones de alimentación resulta difícil obtener los valores mencionados aún con suplementación por lo que resulta de mayor interés práctico mejorar la relación Met/Lys aunque los aportes de dichos AA expresados como porcentajes de la PM sean mucho más bajas.

Los resultados obtenidos demostraron que la suplementación con AAP mejora los aportes de Met y Lys al duodeno y mejora su balance, pero para una correcta implementación de la práctica se debe conocer el consumo de MS de los animales y específicamente el de forraje y concentrado ya que cada una de estas fuentes hace aportes diferentes de estos dos AA.

Algo muy importante de resaltar en esta evaluación es que tanto la relación de Lys:Met predicha y observada fueron más altas a las recomendadas por el NRC de 3:1. Los valores de la relación Lys: Met 3.17:1 + 0.07 y 3.21:1 + 0.11 para los



valores predichos y observados respectivamente. Poder mejorar esta relación podría ayudarnos a mejorar el perfil de aminoácidos que llega al ID y de esta forma “mejorar la síntesis de proteínas lácteas debido a que parece que esta relación puede alterar la expresión de genes en la glándula mamaria” (Nan et al, 2014).

En el presente trabajo, el aporte suplementario de ambos AAP no se tradujo en aumentos en la producción de leche (Tabla 6) pero se detectó una tendencia hacia un mayor contenido de lactosa ( $p=0.08$ ) y la producción de leche corregida al 4%LCG ( $P=0.11$ ). Estos efectos pudieron ser consecuencia de un mayor aporte de Met y Lys al ID (tabla 5) y como consecuencia a un mayor flujo de estos AA hacia la glándula mamaria. La ausencia de diferencias entre tratamientos para los valores de BHB sugiere que los AA no fueron catabolizados para satisfacer requerimientos energéticos sino canalizados hacia una mayor producción de grasa y lactosa en la leche (ver Tabla 6). Debe destacarse también que pese a un aporte estimado de AA superior al requerimiento en los animales suplementados con AAP los valores de urea en leche (MUN) fueron similares lo que sugiere que la desaminación y ulterior producción de urea no fue la ruta prevalente.

La producción de leche corregida por grasa y la síntesis de lactosa parecen resultar incrementados por la Lys y la Met ya que ambos AA pueden mejorar la utilización de energía por parte las vacas lecheras, además están a su vez involucrados en la síntesis de lípidos y fosfolípidos (Colin-Schoellen et al., 1995). Cabe destacar que la Lys es un AA cetogénico mientras que la Met es un precursor gluconeogénico resultando además el AA que da inicio a la síntesis de proteínas (Nelson y Cox, 2009), lo que podría ayudar a mejorar la producción de glucosa y por consiguiente aumentar el contenido de lactosa en la leche.

En el presente trabajo, la falta de efecto de los AAP sobre la producción y composición de la leche podría explicarse por el exceso de estos AA debido a una sobreestimación de la deficiencia de Lys y Met en algunos animales. La ausencia de efecto positivo podría también ser atribuida a la ligera magnitud de la deficiencia en Met y Lys de las raciones experimentales, a la variación entre los

aportes de Lys y Met para cada uno de los animales o a la posibilidad que otros nutrientes también pudieran estar limitando o colimitando la respuesta productiva. Dentro de esos nutrientes puede citarse a la histidina ya que la misma co-limita la producción de proteína en dietas basadas en forrajes (Vanhatalo et al 1999).

## **Conclusiones**

La cantidad estimada de proteína metabolizable fue incrementada ante el aporte suplementario de metionina y lisina protegidas debido principalmente al efecto estimulador de la síntesis de proteína microbiana

La cantidad de proteína metabolizable, los aportes y balances de metionina y lisina fueron significativamente diferentes para los dos grupos experimentales, siendo mejorados en el tratamiento con aminoácidos protegidos.

El programa Amino Cow subestimó los aportes de metionina y lisina en vacas alimentadas con pasto kikuyo y alimento concentrado, por lo que las deficiencias de ambos aminoácidos no resultaron tan importantes como lo inicialmente estimado en los animales experimentales.

La producción y composición de la leche no fue mejorada con la suplementación de metionina y lisina protegidas.

En las condiciones del presente ensayo, los resultados sugieren que si un desbalance de aminoácidos en vacas lecheras produciendo 24 kg/día de leche, puede ser satisfactoriamente superado mediante la implementación de estrategias que incrementen la síntesis de proteína microbiana en el rumen y/o el aporte suplementario de aminoácidos no necesariamente protegidos

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue desarrollado en la finca experimental “*Betania*” propiedad de la empresa Solla S.A y los autores agradecemos a los trabajadores, administrador y nutricionistas por su cooperación. Los recursos fueron proporcionados por el

CODI-Universidad de Antioquia y COLCIENCIAS, la cual concedió la beca doctoral del primer autor.

## **Referencias**

**Amino Cow.** 2010. The Mepron Dairy Ration Evaluator. Version 3.5.2. Degussa Corp., Hanau, Germany.

**AOAC.** 1990. Fiber (Acid Detergent) and Lignin in Animal Feed. (973.18). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

**AOAC.** 2002. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

**Armentano L, Swain S, Ducharme G.** 1993. Lactation response to ruminally protected methionine and lysine at two amounts of ruminally available nitrogen. J. Dairy Sci. 76:2963

**Armentano L, Bertics S, Ducharme G.** 1997. Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diet based on alfalfa and heated soybeans. J. Dairy Sci. 80: 1194–1199.

**Bequette B, Nelson K.** 2006. The Roles of Amino Acids in Milk Yield and Components. Ruminant Nutrition Symposium, Best Western Gateway Grand, Gainesville FL

**Broderick G, Stevenson J, Patton R, Lobos N, Olmos J.** 2008. Effect of Supplementing Rumen-Protected Methionine on Production and Nitrogen Excretion in Lactating Dairy Cows. J. Dairy Sci. 91:1092–1102

**Cabrita A, Dewhurst R, Melo D, Moorby J, Fonseca A.** 2011. Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. J. Dairy Sci. 94: 4647- 4656

**Chen X, Gomes M J.** 1995. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. An overview of the technical details. Occasional Publication 1992. International Feed Resources Unit. Rowett Research Institute. Bucksburn Aberdeen. UK. 21 pp

**Colin-Schoellen O, Laurent F, Vignon B, Robert J, Sloan B.** 1995. Interactions of ruminally protected methionine and lysine with protein source or energy level in the diets of cows. *Journal of Dairy Science* 78: 2807-2818.

**Correa H, Pabón M, Carulla J.** 2009. Estimación del consumo de materia seca en vacas Holstein bajo pastoreo en el trópico alto de Antioquia. *Livestock Research for Rural Development* 21(4).

**Doepel L, Pacheco D, Kennelly J, Hanigan M, Lopez I, Lapierre H.** 2004. Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. *J. Dairy Sci.*87:1279–1297.

**Ferret A, Plaixats J, Caja G, Gasa J, Pri P.** 1999. Using markers to estimate apparent dry matter digestibility, faecal output and dry matter intake in dairy ewes fed Italian ryegrass hay or alfalfa hay. *Small Ruminant Research* 33: 145-152.

**Garnsworthy P, Gong J, Armstrong D, Newbold J, Marsden M, Richards S, Mann G, Sinclair K, Webb R.** 2008. Nutrition, Metabolism and Fertility in Dairy Cows: 3. Amino Acids and Ovarian Function. *Journal Dairy Science.* 91, 4190-4197.

**Harris, B.** 2003. Protein intake and dairy cow fertility. UF/IFAS DS46 (Online). Disponible en: <http://ufdc.ufl.edu/IR00004719/00001>

**Iskenderov T y Mamedova K.** 2013. Synthesis of Microbial Protein in Rumen and the Influence of Different Factors on this Process. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.* 39 (1): 131-135.

**Kim C, Choung J, Chamberlain D.** 2001. Responses of milk production to the intravenous infusion of amino acids in dairy cows given diets of grass silage and cereal-based supplements. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 85, 293-300

**Korhonen M, Vanhatalo A, Varvikko T, Huhtanen P.** 2000. Responses to graded postprandial doses of histidine in dairy cows fed grass silage diets. *J. Dairy Sci.* 83: 2596-2608

**Lee C, Hristov A, Heyler K, Cassidy T, Lapierre H, Varga G, Parys C.** 2012a. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 95, 5253-5268.

**Lee C, Hristov A, Cassidy T, Heyler K, Lapierre H, Varga G, de Veth M, Patton R, Parys C.** 2012b. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *Journal of Dairy Science* 95, 6042-6056.

**Nan X, Bu D, Li X, Wang J, Wei H, Hu H, Zhou L, Looor J.** 2014. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. *Physiol Genomics* 46: 268–275.

**Nelson D.N., Cox M.M.** 2009. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Chapter 3: Amino Acids, peptides, and proteins. Fifth ed. Omega., Inc., New York, NY.

**Liu C, Schingoethe D, Stegeman G.** 2000. Corn distillers grains versus a blend of protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows. *J. Dairy Sci.* 83: 2075–2084

**Lundquist R.G, Stern M.D, Otterby D.E, Linn J.G.** 1985. Influence of methionine hydroxy analog and DL-methionine on rumen protozoa and volatile fatty acids. *J. Dairy Sci.* 68:3055-3058.

**Mullins C, Weber D, Block E, Smith J, Brouk M, Bradford B.** 2013. Short communication: Supplementing lysine and methionine in a lactation diet containing a high concentration of wet corn gluten feed did not alter milk protein yield. *J. Dairy Sci.* 96 :5300–5305

**Nichols J, Schingoethe D, Maiga H, Brouk M, Piepenbrink M.** 1998. Evaluation of corn distillers grains and ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:482–491.

**NRC.** 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

**NRC.** 1989. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 6<sup>th</sup> rev. ed. Washington, D.C. National Academy Press. 157 p.

**O'Connor J, Sniffen C, Fox D, Chalupa W.** 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *J. Anim. Sci.* 71:1298–1311

**Overton, T.R., J.K. Drackley, C.J. Otteman-abbamonte, A.D. Beaulieu and J.H. Clark.** 1998. Metabolic adaptation to experimentally increased glucose demand in ruminants. *Journal of Animal Science* 76(11): 2938-46

**Piepenbrink MS, Overton TR, and Clark JH.** 1996. Response of cows fed a low crude protein diet to ruminally protected methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* 79, 1638-1646.

**Piepenbrink M, Schingoethe D, Brouk M, Stegeman G.** 1998. Systems to evaluate the protein quality of diets fed to lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 81 (4): 1046-1061

**Robinson P.** 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* 127:115-126.

**Robinson PH, Chalupa W, Sniffen CJ, Julien WE, Sato H, Fujieda T, Ueda T, and Suzuki H.** 2000. Influence of abomasal infusion of high levels of lysine or methionine, or both, on ruminal fermentation, eating behavior, and performance of lactating dairy cows. *J. Anim Sci* 78: 1067-1077.

**Robinson P, Chalupa W, Sniffen C, Julien W, Sato H, Watanabe K, Fujieda T, Suzuki H.** 1998. Ruminally protected lysine or lysine and methionine for lactating dairy cows fed a ration designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *Journal of Dairy Science* 81: 1364-1373.

**Robinson PH, Fredeen AH, Chalupa W, Julien WE, Sato H, Fujieda T, and Suzuki H.** 1995. Ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows fed a diet designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *Journal of Dairy Science* 78: 582- 594.

**Rulquin H.** 1992. Interets et limites d'un apport de methionine et de lysine dans l'alimentation des vaches laitières. *INRA. Prod. Anim.* 5:29

**Rulquin H, Pisulewski P, Vérité R, Guinard J.** 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, and Delaby L.** 1997. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. *J. Dairy Sci.* 80:2513–2522.

**Salsbury R.L, Marvil D.K, Woodmansee C.W, and Haenlein G.F.** 1971. Utilization of methionine and methionine hydroxy analog by rumen microorganisms *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 54 (3): 390-396

**Schwab C, Satter L, Clay A.** 1976. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. *J. Dairy Sci.* 59: 1254-1270.

**Schwab C, Bozak C, Whitehouse N, Mesbah M.** 1992. Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation. I. Sequence of lysine and methionine limitation. *J. Dairy Sci.*75: 3486-3502.

**Schwab C, Socha M, Whitehouse N.** 1993. Opportunities for rumen protected lysine and methionine in lactating dairy cow nutrition. Rhone-Poulenc Animal Nutrition Symposium, April 20, Guelph, Ontario, Mississauga, Ontario: RPAN, p 3-28.

**Schwab C.** 1996. Rumen-protected amino acids for dairy cattle: Progress towards determining lysine and methionine requirements. *Animal Feed Science Technology* 59: 87- 101

**Singh M, Sharma K, Dutta N, Singh P, Verma A and Mehra U.** 2007. Estimation of Rumen Microbial Protein Supply Using Urinary Purine Derivatives Excretion in Crossbred Calves Fed at Different Levels of Feed Intake. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20(10):1567-1574.

**Sunvold, G. and R. Cochran.** 1991. Technical note: Evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, and indigestible acid detergent fiber as internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. *Journal of Animal Science* 69(12):4951.

**Swanepoel N, Robinson P, Erasmus L.** 2010. Amino acid needs of lactating dairy cows: impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157, 79–94.

**Swanepoel N, Robinson P, Erasmus L.** 2010 a. Amino acid needs of lactating dairy cows: Predicting limiting amino acids in contemporary rations fed to high producing dairy cattle in California using metabolic models. *Anim. Feed Sci. Technol.* doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.08.005

**Van Soest P, Robertson J, Lewis B.** 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.

**Vanhatalo A, Huhtanen P, Toivonen V, Varvikko T.** 1999. Response of dairy cows fed grass silage diets to abomasal infusions of histidine alone or in combinations with methionine and lysine. *J. Dairy Sci.* 82: 2674-2685

**Verbic J, Chen X, Macleod N, Ørskov E.** 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *The Journal of Agricultural Science* 114 (03): 243-248



**Vlassa M, Filip M, Pacalau V, Coman V, Dragomir C.** 2009. Determination of purine derivatives in bovine urine using rapid chromatographic techniques. *Archiva Zootechnica* 12 (4): 59-70

**Weiss W.P, Conrad H.R, St. Pierre N.R.** 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39 (1-2): 95-110

**Williams C, David D, Iismaa O.** 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 59 (03): 381–385.

## **CAPITULO 5. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INDIRECTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS APORTES DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS METABOLIZABLES EN DIETAS DE VACAS LECHERAS**

Este capítulo tiene por objeto, explicar los resultados obtenidos en el capítulo 4, debido a que es necesario comprender si las estimaciones son equiparables con los valores observados. En gran variedad de estudios, las estimaciones son basadas en los valores generadas por diferentes modelos para suplementar aminoácidos, pero en la mayoría de ocasiones, es difícil la explicación de los resultados obtenidos, si estos no se evalúan posteriormente para determinar si son congruentes o no con los resultados observados. Para resolver esto, fueron comparados los valores predichos y observados de diferentes variables usadas en el estudio.

Este capítulo será presentado como artículo a la Chilean Journal of Agricultural research.

## **CAPITULO 5. EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INDIRECTO PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS APORTES DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS METABOLIZABLES EN DIETAS DE VACAS LECHERAS**

M Duque <sup>1,2</sup> M.Sc, R R Noguera,<sup>1</sup> Ph.D, M Olivera,<sup>2\*</sup> Dr.Sci.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA. Medellín, Colombia. <sup>2</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación Biogénesis. Medellín, Colombia.

### **Resumen**

Los valores predictivos del balance de Lys y Met pueden ser estimados a partir de los diferentes modelos, como por ejemplo el Amino-Cow, NRC (2001), Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), los cuales pueden ser utilizados por asesores e investigadores para tomar decisiones mucho más concientes sobre la inclusión o no de aminoácidos protegidos. Sin embargo, el uso de cualquiera de los modelos implica ser precisos en los parámetros de entrada para poder obtener predicciones adecuadas. Basados en la premisa anterior, el propósito de este artículo fue determinar la reproducibilidad y/o concordancia entre las estimaciones iniciales que fueron realizadas antes del período experimental (valores predichos) para determinar los balances de lisina y metionina y los valores obtenidos en el experimento en campo (valores observados). Para ellos fue realizada una prueba t y se determino el valor de CCC y MSPE. La prueba t pareada mostró que las observaciones pareadas fueron diferentes significativamente para CMSf, CMSt, PMicrob, PMicrob digestible y suministro de Met y Lys ( $p < 0.05$ ). Después de realizar el balance de AA pudo verificarse que la deficiencia de Met estimada inicialmente (valores predichos) fue 64.9% superior a la observada (-9.70 vs -3.40). Para el caso de la Lys la deficiencia predicha fue 57.0% superior a la observada (-25.1 vs -10.8). Por otro lado, para todas las variables el CCC fue muy bajo (valores entre 0.02 y 0.34) y sus MSPE fueron muy altos sugiriendo que los resultados de predicción no fueron similares a los valores observados, a excepción del CMSt que tuvo una moderada fuerza de concordancia (CCC de 0.63) y un

MSPE bajo de 4.42. Los resultados muestran que los valores predichos no guardan precisión ni exactitud con respecto a los valores observados. Estos hallazgos indican que se subestimó los aportes de AA provenientes de la dieta y la proteína microbiana que fueron calculados inicialmente y que los valores de entrada en el modelo necesariamente deben ser encontrados con mayor exactitud para generar los balances de Met y Lys.

## **Introducción**

Actualmente la industria, los nutricionistas enfocados al ganado de leche y productores se han interesado en incrementar la producción de proteína láctea debido al sistema de manejo de precios de la leche. La cantidad de AA que llega al ID de los rumiantes procede de tres fuentes: proteína microbiana sintetizada en el rumen (PMicrob), proteína no degradable en rumen (PNDR) y proteína secretada endógenamente (PE). Sistemas de alimentación como el National Research Council (NRC, 2001) y Cornell Net Carbohydrate and Protein System (CNCPS), (O'Connor et al 1993) para el ganado lechero, hacen uso de modelos matemáticos para predecir los requerimientos de los animales (en función del tipo de animal, su nivel de producción y composición de la leche) y los aportes de proteína metabolizable (PM) y aminoácidos metabolizables, especialmente lisina (Lys) y metionina (Met), los cuales han sido considerados por muchos autores como el primer y segundo aminoácido más limitantes para la tasa de síntesis de proteína láctea (Kunkle y Hopkins 1999; Kim et al 1999; Torre y Caja, 2004; Robinson 2010; Patton 2010, Kamalak et al., 2005; Robinson et al, 2011). La metionina y lisina protegidas por lo tanto, han sido desarrolladas y promovidas como productos que pueden incrementar significativamente el porcentaje de proteína láctea (Rulquin and Delaby, 1997; Socha et al., 2005). Sin embargo, los resultados no han sido consistentes. Algunos estudios han demostrado que la concentración de proteína en leche aumenta cuando los animales son suplementados con metionina protegida (Chilliard and Doreau, 1997; Rulquin and Delaby, 1997; Kowalski et al., 2003; Leonardi et al., 2003; Berthiaume et al., 2006,

Samuelson et al., 2001; Lara et al., 2006; Čermáková et al, 2012). Otros estudios, sin embargo no han mostrado este tipo de incrementos (Krober et al., 2001; Younge et al., 2001; Davidson et al., 2008) ni cambios en los parámetros productivos con la suplementación a vacas lecheras (Benefield et al., 2009; Swanepoel et al., 2010).

El programa Aminocow (<http://www.makemilknotmanure.com/aminocow.php>) versión 3.5.2 y el modelo del NRC (2001) permiten predecir el flujo en gramos de Met y Lys hacia el intestino delgado (ID) y con base en este, determinar los balances de estos dos aminoácidos. En un estudio realizado por Patton (2010), el Aminocow a diferencia del NRC (2001) hace una predicción del flujo de proteína metabolizable (PM) mucho menor, aunque el balance de Lys y Met fuera similares para ambos. Otros autores, compararon las estimaciones realizadas a partir de los programas Aminocow, Shield y CPM Dairy, que predicen los balances de Lys y Met, CPM Dairy (Swanepoel et al, 2010) encontrando diferencias en los modelos de predicción para los promedios de PM que llega al ID y las estimaciones de los balances de met y Lys. Estos resultados, permiten evidenciar que cada uno de los modelos tiene formas diferentes para realizar sus predicciones y que es difícil establecer cual de todos estos es más acertado.

Los valores predictivos que pueden estimarse a partir de los diferentes modelos, como por ejemplo el Amino-Cow, pueden ser utilizados por asesores e investigadores para predecir balances a nivel campo y de esta manera tomar decisiones mucho más concientes sobre la inclusión o no de aminoácidos protegidos. Sin embargo, el uso de cualquiera de los modelos implica ser precisos en los parámetros de entrada para poder obtener predicciones adecuadas. Basados en la premisa anterior, el propósito de este artículo fue determinar la reproducibilidad y/o concordancia entre las estimaciones iniciales que fueron realizadas antes del período experimental (valores predichos) para determinar los balances de lisina y metionina y los valores obtenidos en el experimento en campo (valores observados). Es importante resaltar, que en ambos casos los valores

predichos y los valores observados son estimaciones, que implica aceptar algunos supuestos y por lo tanto, no son en si mismas “observaciones reales”.

## **Materiales y Métodos**

**Localización.** El trabajo experimental fue realizado en la hacienda “Betania”, localizada en el municipio de Santa Rosa de Osos (Ant), a una altura de 2550 msnm, con una temperatura promedio de 14<sup>o</sup> C, humedad relativa del 79% y una precipitación anual promedio de 2500 mm (IDEAM, 2001).

**Manejo y alimentación.** Las vacas lecheras fueron manejadas en un sistema de pastoreo rotacional por franjas con pasto Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*). Agua fresca y sal mineral a voluntad estaban siempre disponibles para los animales.

**Animales.** Fueron seleccionadas 12 vacas Holstein multíparas, en el segundo tercio de lactancia, con máximo de 150 días de lactancia, con producción promedio de 24.0 ± 4.76 litros por día y entre 2 y 5 partos. Los animales fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: Control: Animales consumiendo pasto kikuyo más alimento concentrado, MetLys: Animales consumiendo pasto Kikuyo, alimento concentrado y suplementación con aminoácidos protegidos (metionina y lisina).

## **Balances de Met y Lys predichos y observados**

Para poder llevar a cabo las determinaciones del balance de Met y Lys para cada uno de los animales fueron necesarias las estimaciones predichas de los requerimientos de Met y Lys y las predichas y observadas del suministro de AA que llega al ID, calculadas utilizando la cantidad de proteína metabolizable, la cual incluye la fracción digestible de la proteína no degradable en rumen (PNDR), la proteína microbiana (PMicrob) y la proteína endógena (PE).

## **Estimación de los requerimientos de las vacas lecheras**

Usando el programa AC fueron estimados los requerimientos de Met y Lys para cada animal, el cual usa un enfoque factorial para establecer los requerimientos de

los aminoácidos. Para las vacas en producción, los factores como mantenimiento, producción de leche y crecimiento corporal fueron considerados. El crecimiento corporal es calculado si el animal tiene menos que 48 meses de edad y menos del tamaño corporal ideal. Para el caso específico de este trabajo, el peso maduro fue de 580 Kg.

Fueron colectados para cada uno de los animales el peso vivo (PV), días en leche, edad, producción de leche y % de proteína.

El cálculo de los requerimientos de metionina (Met) y lisina (Lys) se presenta en la Tabla 1 (Aminocow, 2010)

Tabla 1. Requerimientos de Met y Lys para vacas lactantes

| <b>Met</b>   | <b>Lys</b>   |
|--|--|
| METmant = 0.0272 * (PV ^ 0.75)                                       | LYSmant = 0.0932 * (PV ^ 0.75)                             |
| METleche = Pdn leche * % PC proteína leche * 0.38572                 | LYSleche = Pdn leche * % CP proteína de la leche * 1.16072 |
| METgan = Factor de ganancia * 13.3                                   | LYSgan = Factor de ganancia * 46                           |
| <b>METreq = METmant + METleche + METgan</b>                          | <b>LYSreq = LYSmant + LYSleche + LYSgan</b>                |
| Factor de ganancia de peso = PV maduro - PV vaca/365 - días en leche |  |
| PV maduro = 580 Kg   |  |

METmant: Requerimientos de Metionina para mantenimiento, METleche: Requerimientos de metionina para producción de leche, METgan: Requerimientos de metionina para crecimiento, METreq: Requerimiento total de metionina, LYSmant: Requerimientos de lisina para mantenimiento, LYSleche: Requerimientos de lisina para producción de leche, METgan: Requerimientos de lisina para crecimiento, METreq: Requerimiento total de lisina.

### **Aportes de aminoácidos: Valores predichos y observados**

La cantidad de AA que llega al ID se estima a partir de la cuantificación de cada una de sus fuentes: proteína microbiana sintetizada en el rumen (PMicrob), proteína no degradable en rumen (PNDR) y proteína secretada endogénamente (PE). Estas fuentes de PM fueron estimadas con las fórmulas que están incluidas en el programa AC, las cuales requieren de algunos datos como el CMS, cantidad

de PNDR de cada una de las fuentes utilizada en la alimentación de los animales y TDN de los alimentos usados en la dieta.

Con base en las estimaciones de las fuentes de PM, fueron determinados los balances de Lys y Met. En el caso que fueran encontrados desbalance en estos dos AA, la deficiencia sería la cantidad a suplementar de Met y Lys.

Como fue mencionado anteriormente, para la estimación y cuantificación de los aportes predichos y observados fueron necesarios los datos de CMS del forraje y del alimento concentrado antes y después del experimento, estimados inicialmente (valores predichos) mediante aforo de entrada y salida de los animales oferta menos el rechazo para el CMSf y CMSc respectivamente. La estimación de la producción de proteína microbiana fue realizada teniendo en cuenta el CMSt y el TDN de cada una de los ingredientes de la dieta y la cantidad de PE calculada con el CMSt. De otro lado, fueron requeridos los mismos datos para determinar los valores observados de los balances de AA, los cuales fueron obtenidos con la estimación del CMS usando óxido de cromo y LDA y para la producción de proteína microbiana mediante derivados púricos y creatinina. Para el cálculo del aporte de AA que hace la proteína endógena al ID para los valores predichos y observados, fue usada la fórmula del AC, la cual usa el CMSt de los animales.

Fueron usados algunos valores que usa el AC por defecto, como fueron el asumir que la proteína microbiana tiene un 60% de proteína verdaderamente disponible y la digestibilidad de los AA de origen microbiano es del 80%, cuyo valor puede ser editable en este programa. El valor asumido para la digestibilidad de los aminoácidos endógenos fue del 80% y este valor no puede ser editado en el AC.

### ***Met y Lys desde la PNDR predicha y observada***

El suministro de Met y Lys que hace la PNDR al intestino delgado y el porcentaje de digestibilidad intestinal de estos dos aminoácidos fue estimada antes de iniciado el experimento, determinándose la composición del pasto kikuyo y del suplemento comercial y su perfil de aminoácidos inicial, después de la incubación ruminal de 27,4 h (valor determinado por la medición de la tasa de pasaje del



material sólido para esta dieta, la cual fue de 0.0365/h) y del residuo del alimento después de la digestibilidad intestinal que fue encontrado en las heces (Duque et al, capítulo 3). Los valores obtenidos fueron usados como predichos (valores estimados antes de realizar el experimento en campo) y observados (valores estimados que son obtenidos después de la fase experimental en campo), cuya diferencia radica en los valores de CMS del forraje para los cálculos de los aportes.

### ***Met y Lys desde la PE predicha y observada***

Los cálculos para la determinación de la proteína endógena fueron calculados con la misma fórmula para obtener tanto los valores predichos como observados de acuerdo con el programa AC, los cuales están basados en el consumo de MS del kikuyo y del concentrado, siendo utilizado para encontrar los valores predichos, el consumo de forraje estimado por el aforo de entrada y salida y para los observados el uso de marcadores (interno y externo). La fórmula usada fue la siguiente:

$$PE = 11,87 \text{ g/kg} \times \text{CMS (kg) del alimento}$$

$$PE \text{ Met} = 0,11 \text{ g/kg} \times \text{CMS (kg) del alimento}$$

$$PE \text{ Lys} = 0,40 \text{ g/k} \times \text{CMS (kg) del alimento}$$

### ***Met y Lys desde la PMicrob predicha y observada***

***Aportes predichos.*** Los aportes del flujo de AA desde la producción de la proteína microbiana fue estimada por el NRC (2001) a partir del valor de TDN del alimento consumido, y por los CMS del concentrado y del forraje, obtenido por diferencia agronómica entre la producción de forraje (oferta forrajera), y el remanente una vez defoliada el área destinada para el día, de los animales que serían incluidos en el estudio experimental.

### *Estimación del CMSf*

Se aforó preliminarmente el potrero donde ingresaron los animales experimentales, con el fin de cuantificar la biomasa de pasto disponible y determinar la oferta de pasto por vaca por día. Con el aforo de entrada realizado se determinó que la cantidad ofertada fue de 2.3 Kg de forraje verde/ m<sup>2</sup> y el desperdicio dejado por los animales al finalizar el período de pastoreo fue del 40%, indicando que el 60% de la oferta realizada fue aprovechada y el área de pastoreo fue 86 m<sup>2</sup>/vaca/día. El consumo fue estimado por diferencia agronómica entre la producción de forraje, y el remanente una vez defoliada el área destinada para el día. Por lo tanto, el consumo final de forraje estimado de 13 Kg MS/vaca/día. Deberían haberse obtenido consumos individuales. No se entiende lo que realmente se está comparando.

*Estimación del CMS del forraje (CMSf) mediante la oferta forrajera y producción de proteína microbiana total (PMicrob)*

*Estimación de PMicrob.* La cantidad de proteína microbiana sintetizada fue calculada por la fórmula del NRC (2001), la cual requiere los datos del total de nutrientes digestibles de los alimentos, CMSf y CMSc.

$$PMicrob \text{ (g/d)} = (0.13 * TDN \text{ consumido (Kg)} * 1000$$

$$TDN \text{ consumido} = \text{Kg MS consumida} * \% TDN$$

Los valores de TDN para el suplemento y el forraje fueron de 76 y 60.4 % respectivamente. El TDN del forraje y del concentrado fue estimado utilizando el modelo desarrollado por Weiss et al. (1992).

**Aportes observados.** La determinación de los aportes de la dieta (valores observados) al flujo de la proteína microbiana y AA al intestino delgado para estimar el balance o deficiencia de los AA fue realizado mediante la cuantificación del consumo de forraje por oxido de cromo y LDA y la producción de proteína

microbiana de los animales mediante derivados púricos y creatinina durante el período de experimentación.

#### *Estimación del CMSf y PMicrob*

Los mismos animales a los que se les determinó el balance inicial de Met y Lys, fueron usados para la suplementación con estos dos aminoácidos protegidos. El período experimental fue de 20 días, en el cual los primeros 14 días fueron de adaptación a la dieta y los días 18,19 y 20 después de iniciado el experimento fueron para la toma de muestras de forraje, orina y heces.

#### *Estimación de PMicrob*

Las muestras de orina fueron obtenidas de los 12 animales experimentales y fueron colectadas según la metodología propuesta por Chen y Gómes (1992) durante los días 18, 19 y 20 del período experimental. Las muestras se colectaron mediante estimulación del clítoris, en dos horarios diferentes en la mañana y tarde después del ordeño. Cada muestra de orina fue filtrada y 5 mL fueron diluídos inmediatamente en 45 ml de ácido sulfúrico a 0.036 N para formar alícuotas de 50 ml. Las muestras fueron almacenadas a -20°C para la determinación de derivados púricos (Oliveira et al., 2001). Los análisis de ácido úrico fueron realizados por el método de uricasa, la creatinina fue determinada por el método colorimétrico, descrita por Chen y Gomes (1995) y la alantoina fue evaluada mediante la técnica de HPLC en el laboratorio de Análisis instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.

La concentración de derivados de purina (DP) en las muestras de orina (mmol/L) se obtuvo a través de la suma de la concentración de alantoína (mmol/L) y ácido úrico (mmol/L).

$$DP \text{ (mmol/L)} = \text{Alantoina (mmol/L)} + \text{Ácido úrico (mmol/L)}$$

La cuantificación de la excreción diaria de derivados de purina (DPE) fue obtenida mediante la siguiente fórmula:

$$DPE = ((DP * (PV * Kct)) / 113.12) / CT$$

Dónde: DPE: Excreción diaria de derivados de purina (mmol/d), DP: Concentración de los derivados de purina en la muestra de orina (mmol/L), PV: Peso vivo (Kg), CT: Concentración de creatinina en las muestras de orina (mmol/L) y Kct: Coeficiente de excreción diario de creatinina (mg/d) =  $113 * PV^{-0.25}$ , valor propuesto por Chen et al (1995).

La estimación de la absorción diaria de purinas (AP) proveniente de los ácidos nucleicos microbianos fue calculada según Chen y Gomes (1995):

$$PA \text{ (mmol/d)} = ((DPE - (0.385 * PV^{0.75})) / 0.85$$

Donde: PA: Purinas absorbidas por día (mmol/d), DPE: Excreción diaria de derivados de purina (mmol/d),  $0.385 * PV^{0.75}$ : Aporte endógeno de derivados de purina (mmol/Kg de PV metabólico) y 0.85: Recuperación de purinas absorbidas como derivados de purinas (Verbic et al., 1990).

El flujo intestinal de los compuestos nitrogenados microbianos (NM, g N/día) fue calculado a partir de las purinas microbianas absorbidas (PA, mmol/d) utilizándose la ecuación:

$$NM = (PA * 70) / (0.83 * 0.116 * 1000)$$

Dónde: NM: N microbiano (g/d), PA: Purinas absorbidas (mmol/d), 70: Contenido de N en las purinas microbianas (mg N/mmol), 0.83: Factor de digestibilidad de las purinas, 0.116: tasa de N de las purinas (N total en los microorganismos ruminales, expresado por la razón 11.6/100) y 1000: Factor de corrección de mg a gramos (Chen y Gomes, 1995).

La proteína microbiana total producida (PMicrob, g/d) fue calculada:

$$PMicrob = NM * 6.25$$

Siendo MN: Nitrógeno microbiano (g/d) y 6.25: Coeficiente estándar del contenido de N de las proteínas (100/16).

*Estimación del CMSf.* El consumo de materia seca fue medido mediante la utilización de óxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) como marcador externo y lignina en detergente ácido (LDA) como marcador interno. El óxido de cromo fue suministrado vía oral en dosis de 5 gr, dos veces al día (en el ordeño de la mañana y de la tarde). El procedimiento fue realizado durante 9 días, que corresponde al día 12 después de iniciado el período experimental: en los primeros 6 días fue obtenido el equilibrio de la ingestión y la excreción del indicador y, a partir del 7 día, se realizaron las colectas de heces dos veces al día en el ordeño de la mañana y tarde, de manera manual directamente desde el recto tomando una muestra de 250 g, aproximadamente, las cuales fueron congeladas hasta el día final del experimento, para mezclarlas finalmente obteniendo una sola muestra por cada vaca, la cual fue secada a 60°C por 72 horas y conservadas hasta el análisis de MS, LDA (Riquelme y Pulido, 2008) y contenido de cromo, determinado con ayuda de un espectrofotómetro de absorción atómica, conforme la metodología descrita por Williams et al (1962). El CMS del concentrado fue cuantificado mediante el pesaje del alimento una vez el animal llega a la sala de ordeño.

La producción fecal y el consumo de MS del forraje fueron estimados utilizando la siguiente fórmula (Ferret et al., 1999, Correa et al., 2009):

$$PF ((g \text{ MS/vaca})/d) = \frac{(\text{Cromo administrado, g/d})}{\text{Concentración de cromo en las heces, g/g de MS}}$$

Dónde:

PF = Producción fecal, g de MS/día

$$CMSf (Kg/vaca/d) = \frac{(LDA \text{ heces} * PF) - (LDAc * CMSc)}{LDAf}$$

Dónde:

CMSf = Consumo de MS del forraje, Kg/vaca/día

PF = Producción total de heces, Kg de MS/día

LDA heces = Lignina en detergente ácido encontrado en las heces del animal, %

LDAc = Lignina en detergente ácido del concentrado, %

CMSc = Consumo de MS del concentrado, Kg/vaca/día

LDAf = Lignina en detergente ácido del forraje,

Fue asumida una tasa de recuperación de cromo en las heces de 80% (Correa et al 2009). El CMS del total fue determinado como el CMS total (CMSt) más el CMS del suplemento o.

### **Variables estimadas por el programa AC**

Las siguientes variables fueron estimadas por las fórmulas del programa AC para obtener el balance de Met y Lys: Requerimiento de Met (MET Req, g/d), Requerimiento de Lys (LYS Req, g/d), suministro de Met (g/d), suministro de Lys (g/d), Balance de Met y Lys (g/d) predicho y observado. La producción de proteína microbiana total (PMicrob, g/d) y proteína microbiana que se absorbe en el ID (PMicrob digestible, g/d) fueron estimadas por el NCR (2001).

### **Análisis estadístico**

Se realizó una prueba t para muestras pareadas con la finalidad de evaluar si la diferencia de las medias entre las observaciones pareadas de cada una de las variables (observados vs predichos) fue significativa. Un nivel crítico del 5% fue usado para el error tipo I. Para complementar la información se realizó un análisis de estadística descriptiva con la finalidad de obtener los promedios y desviaciones estándar entre los valores observados y predichos. La información fue procesada utilizando el programa estadístico SAS (2001).

La evaluación comparativa de la eficiencia de predicción fue desarrollada por la evaluación del cuadrado medio del error de predicción (MSPE), como lo describió Bibby y Toutenburg (1977), siguiendo la siguiente ecuación:

$$MSPE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)^2$$

Donde:

X = valores observados

y= valores predichos

Para todos los cálculos de varianza, el total de observaciones (n) fue utilizado como divisor.

El coeficiente de correlación de concordancia (CCC), conocido como el índice de reproducibilidad, el cual considera simultáneamente exactitud y precisión, fue calculado acorde con Lin (1989) para las variables CMSf, CMSt, PMicrob digestible, suministro y balance de Lys y Met.

## Resultados

Los promedios y desviaciones estándares del CMS del forraje, CMS total, producción de proteína microbiana total y absorbible, Requerimiento de Met y Lys, Suministro de Met y Lys, Balance de Met y Lys predichos y observados se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Valores observados y predichos para las diferentes variables evaluadas

| Variable                 | Predichos    | Observados   | P value |
|--------------------------|--------------|--------------|---------|
| CMSf (Kg MS/d)           | 13.0 ± 0.0a  | 11.7 ± 1.74b | 0.03    |
| CMSt (Kg MS/d)           | 20.6 ± 2.2a  | 19.3 ± 2.44b | 0.02    |
| Pmicrob (g/d)            | 1772 ± 198b  | 2160 ± 392a  | 0.0002  |
| Pmicrob digestible (g/d) | 851 ± 95.8b  | 1037 ± 188a  | 0.0002  |
| MET Req (g/d)            | 32.0 ± 4.20  | 32.0 ± 4.20  | -       |
| LYS Req (g/d)            | 103 ± 10.5   | 103 ± 10.5   | -       |
| Suministro de Met (g/d)  | 22.1 ± 1.76  | 28.6 ± 4.68  | 0.01    |
| Suministro de Lys (g/d)  | 77.9 ± 5.79  | 92.1 ± 13.2  | 0.001   |
| Balance Met (g/d)        | -9.70 ± 2.92 | -3.40 ± 3.98 | 0.01    |

|                   |              |              |       |
|-------------------|--------------|--------------|-------|
| Balance Lys (g/d) | -25.1 ± 6.21 | -10.8 ± 12.6 | 0.001 |
|-------------------|--------------|--------------|-------|

<sup>1</sup> CMSf: Consumo de MS de forraje, CMSt: Consumo de MS total = CMSf+CMSc, Pmicrob: producción de proteína microbiana, Pmicrob digestible: Producción de proteína microbiana que se absorbe en ID, MET Req: Requerimiento de Met, LYS Req: Requerimiento de Lys, Balance de Met: Suministro de Met metabolizable total – Met Req, Balance de Lys: Suministro de Lys metabolizable total – Lys Req

La prueba t pareada muestra que la media de la diferencia entre las observaciones pareadas fue diferente significativamente para CMSf, CMSt, PMicrob, PMicrob digestible y suministro de Met y Lys (p<0.05).

Después de realizar el balance de AA pudo verificarse que la deficiencia de Met estimada inicialmente (valores predichos) fue 64.9% superior a la observada (-9.70 vs -3.40). Para el caso de la Lys la deficiencia predicha fue 57.0% superior a la observada (-25.1 vs -10.8). Estos hallazgos indican que se subestima los aportes de AA provenientes de la dieta y la proteína microbiana que fueron calculados inicialmente.

En la tabla 3 se presentan las comparaciones entre los estimativos obtenidos por los valores predichos y observados, donde se puede ver que los coeficientes de correlación de Spearman son altos para CMSt y suministro de Met y Lys (0.73, 0.72, 0.57 y 0.67 respectivamente), pero para el resto de estimaciones fueron mucho más bajos. Sin embargo, para todas las variables el CCC fue muy bajo (valores entre 0.02 y 0.34) y sus MSPE fueron muy altos sugiriendo que los resultados de predicción no fueron similares a los valores observados, a excepción del CMSt que tuvo una moderada fuerza de concordancia (CCC de 0.63) y un MSPE bajo de 4.42. Los resultados muestran que los valores predichos no guardan precisión ni exactitud con respecto a los valores observados.

Tabla 3. Correlación, cuadrado medio del error de predicción y coeficiente de correlación de concordancia para las variables evaluadas



| Variable                 | R    | MSPE    | CCC  |
|--------------------------|------|---------|------|
| CMSforraje (Kg MS/d)     | -    | 4.36    | -    |
| CMStotal (Kg MS/d)       | 0.73 | 4.42    | 0.63 |
| Pmicrob (g/d)            | 0.42 | 203.237 | 0.18 |
| Pmicrob digestible (g/d) | 0.42 | 46.826  | 0.18 |
| Suministro de Met (g/d)  | 0.72 | 21.62   | 0.34 |
| Suministro de Lys (g/d)  | 0.57 | 343     | 0.12 |
| Balance Met (g/d)        | 0.40 | 21.58   | 0.10 |
| Balance Lys (g/d)        | 0.40 | 343     | 0.10 |

r: Coeficiente de correlación de Spearman, MSPE: Cuadrado medio del error de predicción, CCC: Coeficiente de correlación de concordancia

## Discusión

El promedio del CMSf encontrado predicho y observados en este estudio fueron similares a los datos publicados por Correa et al (2010) quienes han encontrado un CMS promedio del pasto kikuyo de  $11.0 \pm 2.98$  y  $13.6 \pm 3.74$  estimados mediante la fibra en detergente ácido indigestible (FDAi) *in vitro* e *in situ* respectivamente. Datos de producción de proteína microbiana encontrados en el mismo sistema de alimentación reportados por Correa et al (2006) fueron completamente diferentes a los hallados en este trabajo. Los datos encontrados para el flujo de proteína microbiana hacia el duodeno fue de  $482.9 \pm 509.7$  g/vaca/d presentando un coeficiente de variación muy alto (105.5%) mientras que en este caso la producción de PMicrob total observada fue de  $2160.4 \pm 392.0$  con un coeficiente de variación del 18.1%, mucho más bajo. Sin embargo, la producción de proteína microbiana parece ser variable entre los animales.

La falta de información en la literatura internacional, específicamente de PM producida en vacas lecheras que basen su dieta en pastoreo, limita la comparación de los datos obtenidos en este experimento. Oliveira et al (2001) evaluaron la producción de proteína microbiana en dietas que contenían un 60% de ensilaje de maíz y 40% de concentrado encontrando valores máximos de N microbiano de 198.05 y 196.96 g/d. Si los anteriores resultados son multiplicados

por 6.25, se encuentra que el flujo de proteína microbiana al duodeno sería de 1.231 y 1237.8 g/d, similares a los encontrados en este trabajo.

Como puede observarse tanto el CMSf y CMSt fueron estadísticamente diferentes entre los datos predichos y observados, cuando fue evaluada la concordancia del modelo. Es muy importante este punto, ya que las desviaciones entre el consumo predicho y estimado influirán sobre los mayores o menores aportes de aminoácidos al intestino delgado. Es necesario tener en cuenta que los cálculos para determinar los balances de aminoácidos se basan en un sistema aditivo. Tanto los aportes que hace la PNDR, la PMicrob y la PE incluyen la variable consumo dentro de sus ecuaciones. Si esta variable varía considerablemente con respecto al valor promedio determinado inicialmente, también se encontrarán grandes diferencias entre los valores estimados y reales en las determinaciones finales del balance de Met y Lys debido a que estos balances recogen las diferencias encontradas en el resto de determinaciones. Con base en la premisa anterior y los resultados anteriores (ver tabla 2), el punto más limitante para la determinación de los balances reales de Met y Lys es el CMS del forraje y la cuantificación de la producción de proteína microbiana, debido a que los valores predichos y observados no fueron similares, haciendo que las demás estimaciones de las otras variables también se vean influenciadas.

En este estudio, los resultados muestran claramente que a pesar de que los animales fueron escogidos lo más homogéneamente posible y se realizó un balance de Met y Lys inicial, con el fin de conocer la cantidad a suplementar de metionina y lisina protegidas, los balances fueron diferentes estadísticamente porque estos fueron influenciados ampliamente por las diferencias en el CMSf y la síntesis de PMicrob, la cual contribuye al aporte final de AA que llega al ID.

De acuerdo con nuestros resultados, Patton (2009) sugirió que para poder hacer un adecuado balance de AA se debe conocer el verdadero CMS del grupo de animales. Si esto no es posible, el balance de AA no puede ser hecho. A su vez, el plantea que los modelos para estimar los CMS están basados en muchos estudios publicados por lo que se puede estar seguro que son más que una

conjetura. Sin embargo, las diferencias entre los modelos para estimar el CMS puede ser de hasta 1.5 kg en la ingesta prevista para un mismo animal y obviamente esta diferencia en el consumo puede cambiar el flujo de AA hacia el intestino delgado.

Cuando se compararon los balances de AA predichos y observados para la Met y Lys, observamos que los valores reales fueron diferentes a los valores estimados (Met y Lys estimada  $-9.70 \pm 2.92$  y  $-25.1 \pm 6.21$  vs Met y Lys reales  $-3.40 \pm 3.98$  y  $-10.8 \pm 12.6$  g/d) y las desviaciones estándar también fueron mucho más amplias cuando se estiman los aportes de AA con los valores reales, porque se encuentran mayores diferencias entre los animales en cuanto a las variables consumo de forraje y PMicrob. Con estos resultados podemos decir, que las variaciones en las respuestas a la suplementación de Lys y Met protegidas puede radicar en que los verdaderos aportes de AA que llegan al ID son diferentes a los estimados por los modelos y se puede subestimar o sobrevalorar los aportes, si la variable predicha tiene una desviación muy grande con respecto a la observada, produciéndose por lo tanto CCC muy bajos y MSPE altos, como lo fue para este caso.

Las diferencias encontradas en la estimación de la proteína microbiana en los valores estimados y reales podrían deberse a que la fórmula de estimación está basada en el TDN y el uso de esta variable incluye la energía aportada por las grasas, el cual no es un sustrato energético utilizado por los microorganismos ruminales para su crecimiento (Galyean y Tedeshi, 2014). Adicionalmente, la fórmula asume una eficiencia constante, y esta podría subestimar la producción de PMicrob en dietas con altos niveles de concentrado, ya que las bacterias no crecen con igual eficiencia cuando fermentan fibra que cuando lo hacen con carbohidratos solubles. Czerkawski (1986) reporta que las eficiencias pueden variar entre el 13 y el 33%, por lo que es un error asumir un valor constante.

Una estimación más adecuada para la síntesis de PMicrob hubiese sido incluyendo la materia orgánica fermentable, ya que las dietas que son mas fermentables aportan más energía y favorecen el crecimiento microbiano y puede verse reflejado en una mejor estimación de esta variable. Por lo anterior, se puede

decir que son subvalorados los valores de proteína microbiana metabolizable (absorbible) estimados con la fórmula del NRC (2001).

A su vez, la relación forraje concentrado de la dieta observada fue de 61:39, relación que al parecer mejora la eficiencia de producción de proteína microbiana porque la adición de carbohidratos fermentables en el rumen (desde el concentrado) permite la liberación de ATP requerido para el crecimiento microbiano. Las tasas de fermentación de almidones y azúcares solubles son muy altas hasta las 2 horas pos-alimentación pero disminuyen casi por completo a las 4 h pos alimentación, mientras que la degradación de la celulosa y hemicelulosa (desde el forraje) inician sólo desde las 3 a 4 h pos-alimentación y puede continuar por largos períodos de tiempo (96 horas pos-alimentación), proporcionando de esta manera ATP para el crecimiento microbiano más tardío (Iskenderov y Mamedova 2013). Por lo tanto, esto permite que la producción de P<sub>Microb</sub> sea también mayor en el tiempo.

Esto es apoyado por Czerkawski (1976), quien dice que consumos de mezclas de forraje y concentrado resultan en mayor síntesis de proteína microbiana comparados con consumos de sólo concentrado o forraje. Adicionalmente, el valor promedio para la relación forraje: concentrado de la dieta en este trabajo fue de 61:39% y se ha reportado que si se suplementa con carbohidratos fermentables en al menos un 30% la eficiencia microbiana se incrementa (Huber y Kung, 1981).

Con relación al CMS del forraje, las diferencias encontradas entre los valores predichos y estimados son debidos a que en el primer caso, no se tienen en cuenta para calcular el CMS<sub>f</sub> de los animales características bromatológicas de la dieta, su ambiente, sus demandas nutricionales y energéticas y por último la selectividad propia de cada uno de los animales. Una de las conclusiones importantes es que para el balanceamiento de dietas por AA limitantes, es que el CMS<sub>f</sub> debe ser previamente determinado para cada individuo debido a que los balances de AA también son realizados individualmente y esta variable está incluida en las determinaciones del resto de variables.

## **Conclusiones**

El Amino Cow es una herramienta de fácil y libre acceso para determinar los balances de Met y Lys, pero para este sistema de alimentación, las estimaciones no fueron adecuadas ya que fue subvalorado los aportes de metionina y lisina hacia el intestino delgado. Por lo tanto, el AC no es un adecuado predictor para estimar las cantidades a suministrar de estos dos aminoácidos para cubrir deficiencias si no se cuenta con información precisa del CMS y PMicrob.

Las limitantes encontradas en este estudio para la predicción de los aportes de metionina y lisina fueron la estimación del consumo de materia seca del forraje y la producción de proteína microbiana.

En sistemas de producción basados en pastoreo, la determinación de los aportes y deficiencias de Lys y Met es compleja, ya que los aportes de AA y el balance real de cada uno de ellos fueron estadísticamente diferentes a las estimaciones iniciales, para suministrar la suplementación con las fuentes protegidas. Este análisis nos corrobora que es necesario contar con información precisa y confiable del consumo de MS del forraje y el consumo total de cada uno de los animales y no solamente de su promedio. Así como también son necesarios los datos sobre la producción de proteína microbiana real.

## **Agradecimientos**

A Colciencias por la beca doctoral del primer autor de este documento.

## **Referencias**

**Amino Cow.** 2010. The Mepron Dairy Ration Evaluator. Version 3.5.2. Degussa Corp., Hanau, Germany.

**Benfield B, Patton R, Stevenson M, Overton T.** 2009. Evaluation of rumen-protected methionine and period length on performance of lactating dairy cows with Latin squares. J. Dairy Sci. 92:4448–4455.

**Berthiaume R, Thivierge M, Patton R, Dubreull P, Stevenson M, McBride B, Lapierre H.** 2006. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:1621–1634.

**Bibby J, Toutenburg H.** 1977. Prediction and improved estimation in linear models. New York. J. Wiley and Sons. 188p.

**Czerkawski J.** 1976. Chemical composition of microbial matter in the rumen. *J. Sci. Food. Agric.* 27: 621-627.

**Čermáková J, Kudrna V, Illek J, Blažková K, Haman J.** 2012. Effects of a rumen-protected form of methionine and a methionine analogue on the lactation performance of dairy cows. *Czech J. Anim. Sci.*, 57 (9): 410–419

**Chen X, Gomes M.** 1995. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives. An overview of the technical details. Occasional Publication 1992. International Feed Resources Unit. Rowett Research Institute. Bucksburn Aberdeen. UK. 21 pp

**Chilliard Y, Doreau M.** 1997. Influence of supplementary fish oil and rumen-protected methionine on milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Res.* 64:173–179.

**Correa H, Pabón M, and Carulla J.** 2009. Estimación del consumo de materia seca en vacas Holstein bajo pastoreo en el trópico alto de Antioquia. *Livestock Research for Rural Development* 21(4).

**Davidson S, Hopkins B A, Odle J, Brownie C, Fellner V, and Whitlow L.** 2008. Supplementing Limited Methionine Diets with Rumen-Protected Methionine, Betaine, and Choline in Early Lactation Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 91 (4): 1552–1559

**Galyean M.L, Tedeschi L.O.** 2014. Predicting microbial protein synthesis in beef cattle: Relationship to intakes of total digestible nutrients and crude protein. *J. Anim. Sci.* 92:5099–5111

**Huber J, Kung J.** 1981. Protein and nonprotein utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 64:1170-1195.

**Iskenderov T y Mamedova K.** 2013. Synthesis of Microbial Protein in Rumen and the Influence of Different Factors on this Process. *J. Fac. Vet. Med. istanbul Univ.* 39 (1): 131-135

**Kamalak A, Canbolat Ö, Gurbuz Y, Özay O.** 2005. Protected Protein and Amino Acids in Ruminant Nutrition. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 8(2):2005.

**Kim C, Choung J, Chamberlain D.** 1999. Determination of the first limiting amino acid for milk production in dairy cows consuming a diet of grass silage and a cereal based supplement containing feather meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(12):1703-1708

**Kowalski Z, Pisulewski P, Gorgulu M.** 2003. Effects of protected methionine and variable energy supply on lactational responses in dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Anim. Feed Sci.* 12: 451–464.

**Krober T, Sutter F, Senn M, Langhans W, Kreuzer M.** 2001. Effects of supplying leucine and methionine to early lactating cows fed silage-concentrate based diets with a calculated deficiency in leucine and methionine. *Anim. Res.* 50:5–20.

**Kunkle W, Hopkins D.** 1999. Is methionine the first limiting amino acid for growing cattle fed forages? In: *Annual Florida Nutrition Symposium*, 10. Gainesville. Proceedings Gainesville: University of Florida p.19-29.

**Lara A, Mendoza G, Landois L, Barcena R, Sánchez- Torres M, Rojo R, Ayala J, Vega S.** 2006. Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livestock Science.* 105: 105–108

**Leonardi C, Stevenson M, Armentano L.** 2003. Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:4033–4042.

**Lin L.** 1989. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 45, 255-268.

**Nan X, Bu D, Li X, Wang J, Wei H, Hu H, Zhou L, Loo J.** 2014. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. *Physiol Genomics* 46: 268–275.

**NRC.** 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.

**O'Connor J, Sniffen C, Fox D, Chalupa W.** 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: IV. Predicting amino acid adequacy. *J. Anim. Sci.* 71:1298–1311.

**Oliveira A, Valadares R, Valadares S, Cecon P, Rennó L, Queiroz A, Chizzotti M.** 2001. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 30(5):1621-1629.

**Parra J.** 2000. Evaluación de la proteína del pasto kikuyo a diferentes edades de crecimiento; Informe de Pasantía de Zootecnia, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 24p.

**Patton R.** 2009. The strategic use of ruminally protected amino acids in dairy nutrition. in: *Proc. Florida Ruminant Nutrition Symposium*, Univ. ; p 39–51

**Patton R.** 2010. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93 :2105–2118



**Riquelme C, Pulido R.** 2008. Efecto del nivel de suplementación con concentrado sobre el consumo voluntario y comportamiento ingestivo en vacas lecheras a pastoreo primaveral. *Arch Med Vet* 40:243-249.

**Robinson P.** 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* 127(2-3):115-126.

**Robinson P, Swanepoel N, Shinzato I, Juchem S.** 2011. Productive responses of lactating dairy cattle to supplementing high levels of ruminally protected lysine using a rumen protection technology. *Anim Feed Sci Tech.* 168:30-41.

**Rueda S, Taborda L, Correa H.** 2006. Relación entre el flujo de proteína microbiana hacia el duodeno y algunos parámetros metabólicos y productivos en vacas lactantes de un hato lechero del Oriente Antioqueño. *Rev Col Cienc Pec* 19 (1): 27 - 38

**Rulquin H, Delaby L.** 1997. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. *J. Dairy Sci.* 80:2513–2522.

**Swanepoel N, Robinson P, Erasmus J.** 2010. Amino acid needs of lactating dairy cows: impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157, 79–94.

**Samuelson D, Denise S, Roffler R, Ax R, Armstrong D, Romagnolo D.** 2001. Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 84:917–928.

**Socha M, Putnam D, Garthwaite B, Whitehouse N, Kierstead N, Schwab C, Ducharme G, and Robert J.** 2005. Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *J. Dairy Sci.* 88:1113–1126.

**Sunvold G, Cochran R.** 1991. Technical note: Evaluation of acid detergent lignin, alkaline peroxide lignin, acid insoluble ash, and indigestible acid detergent fiber as

internal markers for prediction of alfalfa, bromegrass, and prairie hay digestibility by beef steers. *Journal of Animal Science* 69(12):4951.

**Torre C, Caja G.** 2004. Utilización de aditivo en rumiantes: Vitaminas y aminoácidos protegidos XIV Curso de Especialización Avances en nutrición y Alimentación Animal.

**Verbic J, Chen X, Macleod N, Ørskov E.** 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *The Journal of Agricultural Science* 114(03):243-248.

**Weiss W.P, Conrad H.R, St. Pierre N.R.** 1992. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* 39 (1-2): 95-110

**Williams C, David D, Iismaa O.** 1962. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. *The Journal of Agricultural Science* 59(03):381-385.

**Younge B, Murphy J, Rath M, Sloan B.** 2001. Effect of dietary absorbable methionine and lysine concentrations on milk production and composition of dairy cows offered grass-silage based diets. *Ir. J. Agric. Food Res.* 40:1–11.

## **CAPITULO 6. EFFECT OF RUMEN PROTECTED METHIONINE AND LYSINE SUPPLEMENTATION ON MILK PROTEIN COMPOSITION IN DAIRY COWS**

Este capítulo fue desarrollado para cumplir el objetivo específico número 3: Evaluar el efecto de la suplementación con aminoácidos protegidos en la composición de la leche, así como en las concentraciones de las diferentes caseínas (alpha, beta y kappa) y la proteína del suero de la leche (alpha lactoalbúmina). En este capítulo son importantes tanto los resultados del efecto de los aminoácidos protegidos sobre la composición y proteínas lácteas como el procedimiento y el método de evaluación. La estandarización de este método permitió desarrollar de manera confiable y positiva las determinaciones de las diferentes caseínas para este trabajo y a su vez, se pudo ofrecer este servicio a la Universidad Tecnológica de Pereira.

Este capítulo se presentó como artículo a la Revista Journal of Dairy Research.

## **CAPITULO 6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE METIONINA Y LISINA PROTEGIDA EN LA COMPOSICIÓN DE PROTEÍNAS LÁCTEAS EN VACAS HOLSTEIN**

### **Rumen protected methionine and lysine supplementation affected the milk proteins concentration in dairy cows**

Mónica Duque<sup>4,5</sup>, Ricardo Rosero<sup>1</sup>, Martha Olivera<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Grupo de investigación GRICA. Medellín, Colombia. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Grupo de investigación Biogenesis, Medellín, Colombia

**Resumen:** El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de suplementación de metionina y lisina protegida sobre la composición, contenido de alpha-lactoalbúmina y caseínas en la leche. 12 vacas multíparas Holstein, con promedio de producción de 24 + 4.76 kg/vaca/día fueron asignadas a uno de los 2 tratamientos siguientes: grupo control (control): vacas alimentadas con pasto kikuyo y suplemento comercial y grupo experimental (MetLys): vacas alimentadas con la dieta control, más la suplementación con Met y Lys protegidas. El experimento consistió en 14 días de adaptación a la dieta y 6 días del período experimental. Se encontró una tendencia significativa sobre la leche corregida al 4% de grasa ( $p < 0.11$ ) y lactosa ( $p < 0.08$ ) cuando se suplementó con metionina y lisina protegida, siendo mayor en el grupo MetLys que en el grupo control. Fueron encontrados efectos positivos en la composición de las diferentes caseínas de la

---

\* For correspondence; e-mail: martha.olivera@udea.edu.co

leche como alpha S1 y beta caseína sintetizadas en la glándula mamaria. El porcentaje de proteína de la leche no fue afectada significativamente.

**Palabras claves:** Caseinas, alpha S1, alpha S2, kappa,  $\beta$  caseina, aminoácidos protegidos ruminalmente

**Abstract.** The aim of the study was to assess the effects of rumen protected methionine and lysine in the diet on milking parameters and caseins and alpha-lactalbumin contents of milk in dairy cows. Two groups of Holstein-Friesian cows, six each, with average milk production of  $24 \pm 4.76$  kg/day/cow were assigned to two of the following treatments: Control group (Control) was given a traditional diet, where the cows were rotational grazing in kikuyu (*Penisetum clandestinum*) and concentrate and the experimental group (MetLys), had the same diet of control group and were supplemented rumen protected methionine and lysine. The experiment consisted in seven days period for diet adaptation and thirteen days for experimental period. The rumen protected methionine and lysine supplementation affected 4% fat corrected milk and fat percentage, being higher in MetLys than control group ( $p < 0.05$ ). Positive effects were found on composition of different milk caseins such as alpha S1 and beta caseins synthesized by the mammary gland. Milk protein percentage and concentrations of milk metabolites as betahydroxybutyrate (BHB) and milk urea nitrogen (MUN) were not significantly affected.

**Keywords:** Caseins, alpha S1, alpha S2, kappa,  $\beta$  casein, rumen-protected amino acid

## Introducción

La leche bovina contiene alrededor de 3.0 a 3.5 % de proteína (Phadungath, 2005), la cual está compuesta principalmente de 6 proteínas, alpha lactoalbúmina, alpha S1, alpha S2, beta y kappa caseína. Estas proteínas en su conjunto constituyen el 90% del contenido total de proteína (Tay & Gam, 2011). El alto valor nutricional de la leche es debido en parte a las propiedades de estas proteínas. Las caseínas proporcionan aminoácidos esenciales (AAE), fósforo y calcio. Las proteínas del suero de la leche son ricas en AAE como metionina y cisteína y por lo tanto, tienen un alto valor nutricional también (Wit, 1998). Estas proteínas están constituidas en su mayoría por alpha-lactoalbúmina y beta-lactoglobulina, siendo la primera importante para apoyar la síntesis de lactosa (Neville, 2009), mientras que la segunda provee AAE, pero aún su función biológica no está clara.

La síntesis de proteína en la glándula mamaria requiere de los precursores necesarios como la disponibilidad de AA y energía (Bequette *et al.* 1998, Bionaz & Looor 2011). En las vacas lecheras, más de 5 veces es el incremento en los requerimientos de energía y proteína en la etapa de lactancia cuando es comparada con el último tercio de la gestación, por lo que, la disponibilidad de aminoácidos puede ser un factor limitante para la síntesis de las proteínas lácteas (Schingoethe, 1988, Bionaz *et al.* 2012). Cuando es comparada el perfil de la proteína de la leche o de los microorganismos ruminales con los alimentos comúnmente usados en la alimentación de ganado lechero como son el maíz, torta de soya y forrajes a menudo son deficientes en el contenido de lisina y

metionina(NRC, 2001; Correa, 2006). Adicionalmente, la síntesis de proteína microbiana no suministra las cantidades suficientes de AA para cubrir los requerimientos en vacas lecheras de alta producción (Polan *et al.* 1991), lo cual significa que la proteína no degradable en rumen (PNDR) debe ser proporcionada en la dieta para maximizar la cantidad de aminoácidos disponibles para la absorción en el intestino delgado (Samuelson *et al.* 2001; Leonardi *et al.* 2003). Por lo tanto, la disponibilidad de aminoácidos específicos como la metionina y lisina, que a menudo son considerados como los más importantes pueden ser un factor limitante para la síntesis de proteína (Robinson *et al.* 1998). Los aminoácidos (AA) en la glándula mamaria de vacas lecheras no solamente son importantes para la síntesis de proteínas lácteas sino que también son importantes en la producción de energía a través del ciclo de Krebs (Bequette *et al.* 1998). Además, recientes estudios de transcriptómica en vacas lecheras en la preñez y la lactancia establecen que el complejo diana de la rapamicina en células de mamaífero (mTOR) está involucrado en la regulación de la síntesis de proteína, particularmente en la traducción, la cual es indirectamente activada por AA, particularmente por la leucina (Bionaz & Loo 2011; Kimball & Jefferson 2006). Por lo tanto, la suplementación con aminoácidos protegidos como Met y Lys pueden ser efectivos en el mejoramiento del balance de AA para mejorar la producción de proteínas lácteas (Lara *et al.* 2006).

Muchos métodos han sido desarrollados para proteger estos AA desde la degradación microbiana resultando en AA protegidos (AAPR) que pasan al abomaso y al intestino Delgado donde son liberados y absorbidos. Sin embargo,

los resultados en la producción adicionando AAPR han sido variables (Třináciy *et al.* 2009) siendo positivos en algunos casos en el incremento de la producción de leche, contenido y producción de proteína (Lara *et al* 2006, Robinson, 2010).

Hay poca información en la literatura de los efectos de la suplementación con Met y Lys protegidas para vacas lecheras en condiciones de pastoreo, particularmente cuando la proteína metabolizable (PM) puede ser marginal (Correa, 2006). El objetivo de este estudio fue evaluar en vacas lecheras en pastoreo el efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas sobre la composición y concentración de las diferentes proteínas lácteas en vacas lecheras.

## **Materiales y métodos**

### Animales y manejo en el ordeño

El experimento fue realizado en la Finca “Betanía”, localizada en Santa Rosa de Osos (Antioquia, Colombia), a 2500 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 14 °C y humedad relativa de 79%. El promedio de precipitación anual es de 2500 mm (IDEAM, 2001).

12 vacas Holstein lactantes entre 2 y 4 lactancias en  $124.8 \pm 14.0$  días en lactancia, condición corporal de  $3.02 \pm 0.17$ , peso promedio de  $547 \pm 56.1$  Kg, producción promedio de  $24 \pm 4.76$  L/día, proteína de  $2.89 \pm 0.17$  %,  $3.45 \pm 0.42$  de grasa. Las vacas pastorearon Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) en un sistema rotacional con agua a voluntad. Los ordeños fueron realizados dos veces al día a las 4:00 y 14:00 h. Los protocolos de muestreo fueron aceptados por el comité



de ética de la Universidad de Antioquia (Número de procedimiento: 71, Junio 17 de 2011).

### Tratamientos

Doce vacas fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos al iniciar el experimento: Grupo control - animales que pastorearon kikuyo y fueron suplementados con alimentos concentrado sin adición de Met y Lys protegidas, y grupo MetLys – Animales que pastorearon Kikuyo, suplementados con concentrado y Met y Lys protegidas. Los grupos estaban balanceados por número de parto ( $2.83 \pm 0.98$  vs.  $2.67 \pm 0.82$ , respectivamente), grado de condición corporal (CC;  $3.00 \pm 0.16$  vs.  $3.08 \pm 0.20$ ) y días en lactancia (DL,  $131 \pm 13.42$  vs.  $120 \pm 13.86$  días).

A las vacas fue ofrecida las dietas experimentales desde el día 0 hasta el día 20 de experimentación. El período de adaptación constió en los primeros 14 días, seguido del período de evaluación y toma de muestras, que incluyó los 7 días posteriores. El grupo de MetLys fueon suplemnetadas diariamente con 75 g de metionina protegida ruminalmente (MetP) y 190 g de Lys protegida ruminalmente (LysP), suministradas en dos cantidades iguales en cada uno de los ordeños, conteniendo una cantidad neta liberada en el intestino delgado (ID) de  $23.9 \pm 3.82$  g de lisina y  $7.03 \pm 2.93$  g de metionina.

La MetP fue Mepron® (Evonik, Degussa AG, Alemania) y la LysP de AjiPro™-L (Ajinomoto, Tokyo, Japan). El Mepron® es una fuente de metionina protegida por

una capa de etilcelulosa (<http://feed-additives.evonik.com>) y AjiPro™-L es una matriz de L-Lysine·HCl y aceite vegetal que resiste la degradación ruminal (<http://www.ajipro-l.info/>). Los requerimientos de aminoácidos fueron estimados mediante el software AminoCow desde la compañía Adisseo (Amino Cow, 2010) resultando que los aportes de la dieta generaban una deficiencia en Met y Lys del 29.7% y 20.5%.

### ***Análisis de muestras***

La producción de leche individual fue registrada diariamente y las muestras de leche fueron tomadas de cada uno de los ordeños al día 0 y 20 de experimentación. La proteína en leche fue analizada en el laboratorio de leches de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) usando un MilkoScan (MilkoScan™ FT+ from Foss).

### ***Análisis de la composición de la proteína de la leche***

La determinación individual de las proteínas lácteas (alpha S1, alpha S2, beta y kappa caseinas y alpha lactalbumina) fue realizada colectando 15 ml de leche al día 0 y 20 del período experimental, desde los ordeños de la mañana y la tarde. Las muestras fueron mezcladas en la misma proporción de su producción y almacenadas a 20°C para su posterior análisis.

La electroforesis fue usada para la semicuantificación relativa de las concentraciones de las proteínas. La curva de calibración fue generada por el

rango de concentraciones conocidas 1000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25 ug/ml de la proteína albúmina sérica bovina de 66 kDa de peso molecular (BSA Standars ELISA Quantitation Set; Cat. No. 23209; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford IL USA).

Para determinar los verdaderos valores de cada una de las diluciones medidas fue usado un equipo de ELISA a 562 nm (microplates reader ELx800NB). Geles de Tricina-SDS-PAGE fueron preparados para la migración de esta proteína en sus diferentes concentraciones (ver Figura 1). Posteriormente, mediante el software DNR's Gel capture mini software fueron tomadas las imágenes de los geles y las áreas y densidades de estas bandas fueron estimadas usando el GelQuant Express Analysis software (Invitrogen). Una curva estándar entre las densidades de las bandas y su concentración de proteína determinadas por el ELISA fueron ploteadas, obteniéndose una ecuación de regresión usada para estimar las concentraciones de las muestras de interés.

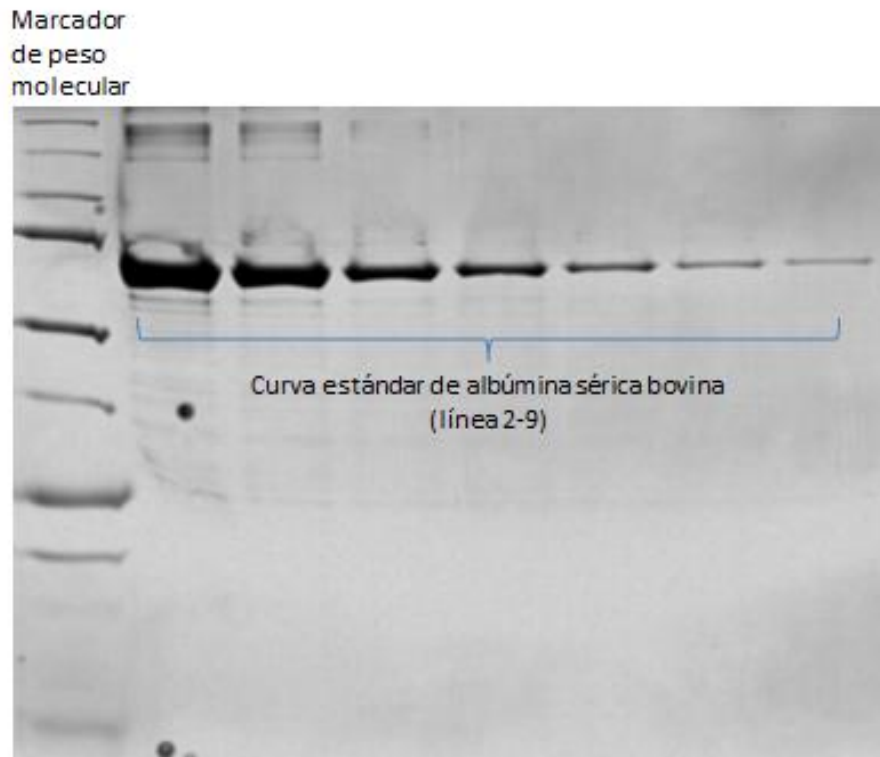


Figura 1. Patrón de electroforesis de la albúmina sérica bovina realizadas en geles de Tricina-SDS-PAGE para obtener la curva estándar. Línea 1. Marcador de peso molecular Bio-rad (Precision Plus protein Dual Color Standars). Línea 2-9. Diluciones seriadas de la albúmina sérica bovina (pureza de 97%) con peso molecular de 66 kDa.

Para la cuantificación de las lactoproteínas, fue usado el siguiente protocolo:  
Prefraccionamiento de la muestra: La grasa de la leche fue removida, colocándose 2 mL de muestra de leche dentro de un eppendorf de 2.5 mL, la cual fue centrifugada a 2500 rcf durante 15 minutos. La fracción soluble fue extraída con una jeringa de 10 mL (Sigma-Aldrich) y fue adicionada dentro de un nuevo eppendorf. 10 uL de esta muestra fue diluída en 240 uL de agua destilada, para obtenerse una dilución de 1:25.

Separación de las lactoproteínas: Cada muestra fue sometida a una electroforesis de una dimensión usando un aparato Mini-Protean III Cell Electrophoresis (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) y geles de Tricina - SDS-PAGE (Natalucci & Pardo, 2002). Los geles de separación eran de 10% T, 3%C y el gel de concentración de 4% T y 3%C. Los geles fueron hechos acorde a la metodología descrita por Schägger (2006), siendo el protocolo comúnmente usado para separar proteínas especialmente en rangos de pesos moleculares desde 5 a 30 kDa, ya que la tricina es usada como un arrastrador de iones que permite una resolución superior de proteínas pequeñas en geles con concentraciones más bajas de poliacrilamida que en sistemas de glicina-SDS-PAGE (Haider et al. 2012). Los pesos moleculares de las diferentes caseínas y alpha-lactoalbúmina en la leche bovina están alrededor de 14 y 26 kDa. Las condiciones del programa de migración de las proteínas en la electroforesis fue de 40 min a 30 V (voltaje constante) y posteriormente de 6-7 horas a 40 mA (corriente constante) para mantener una tasa de migración uniforme de la muestra, permitiendo una mejor separación de las proteínas. Los geles fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue R-250 bajo condiciones constantes de agitación durante 20 minutos (Kim et al. 2011) a temperatura ambiente. Después, los geles fueron desteñidos toda la noche (16 h) en agitación. Las fotografías de los geles fueron tomadas con un DNR Bio-imaging Systems (MiniBIS Pro), y finalmente se procedió a la semicuantificación de las diferentes proteínas, las cuales fueron calculadas en base a la intensidad de color y las áreas individuales de las bandas de cada lactoproteína en cada una de las muestras mediante el GelQuant Express Analysis software (Invitrogen) (Ver Figura 2).

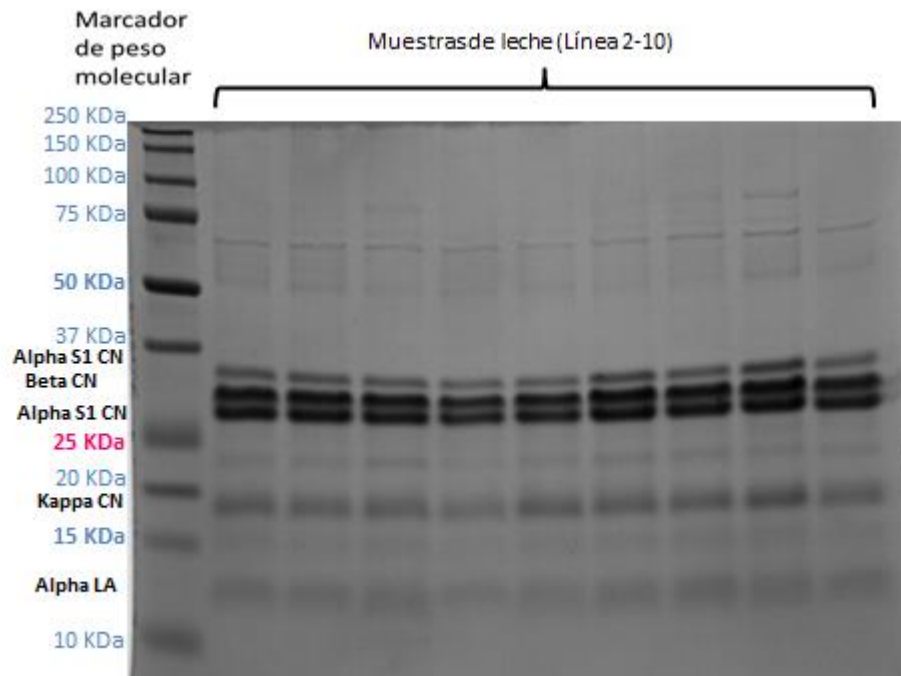


Figura 2. Patrones de electroforesis de las caseínas bovinas y alpha-lactoalbúmina obtenidos desde geles de trichina-SDS-PAGE. Line 1. Marcador de peso molecular Bio-rad (Precision Plus protein Dual Color Standars). Línea 2-10 Muestra de leche bovina.

*Análisis estadístico* Los datos fueron analizados utilizando un modelo mixto considerando el animal como efecto aleatorio y los tratamientos como efecto fijo mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS (2001). La producción de leche al inicio del experimento, los días en lactancia y la CC fueron introducidas en el modelo como covariables. Las variables analizadas fueron producción de leche, porcentaje de proteína y composición en la leche de las diferentes lactoproteínas. Se realizó la comparación de medias con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ , utilizando el procedimiento LSMEANS de SAS (2001).

## Resultados

### *Producción de leche y composición de la proteína láctea*

Los valores de producción de leche, 4%LCG, de proteína, caseínas y alpha-lactoalbúmina obtenidos durante el período experimental, son presentados en la Tabla 1. La suplementación con metionina y lisina protegida tuvo efectos significativos en la concentración de alphaS1 y beta caseína ( $p < 0.05$ ) pero no afecto la producción de leche, 4%LCG, de proteína, kappaCN, alphaS2CN y alpha LA.

Tabla 1. Efecto de la suplementación con metionina y lisina protegida sobre la producción de leche, proteína y las diferentes proteínas lácteas en vacas Holstein

| Variables                     | Control | MetLys | EE    | p     |
|-------------------------------|---------|--------|-------|-------|
| Producción de leche (Kg/día)  | 23.7    | 23.8   | 2.05  | 0.96  |
| 4%LCG (Kg/d) <sup>1</sup>     | 24.2    | 26.0   | 3.42  | 0.10  |
| Producción de proteína (g/Kg) | 3.04    | 3.11   | 0.692 | 0.159 |
| AlphaS1CN (g/Kg)              | 9.44    | 10.58  | 0.593 | 0.046 |
| AlphaS2CN (g/Kg)              | 2.55    | 2.94   | 0.582 | 0.125 |
| BetaCN (g/Kg)                 | 9.58    | 10.35  | 0.592 | 0.051 |
| KappaCN (g/Kg)                | 3.25    | 3.49   | 0.572 | 0.663 |
| Apha LA (g/Kg)                | 1.13    | 1.20   | 0.702 | 0.159 |

a, b Medias en la misma fila con letras diferentes difieren estadísticamente entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), <sup>1</sup>4% LCG: Leche corregida por grasa =  $(0.4 * \text{producción de leche}) + (15 * \text{producción de grasa})$ , AlphaS1CN: Alpha S1 Caseína, AlphaS2CN: Alpha S2 caseína, BetaCN: Beta caseína, KappaCN: Kappa caseína, Alpha LA: Alpha Lactoalbumina.

## Discusión

En este estudio la suplementación con metionina y lisina protegidas tuvo una tendencia significativa al incremento de la 4%LCG, así como un efecto significativo

sobre el perfil de las proteínas lácteas, modificando la producción de las caseínas alpha S1 y beta sin afectar el porcentaje de proteína de la leche.

### *Producción de leche y composición*

Aparentemente, debido a que las vacas experimentales estaban en el segundo tercio de la lactancia, el suministro de energía no fue un factor limitante en la producción de leche que puede ser explicado debido a que ni la suplementación con MetP y LysP afectaron la producción de leche ni el 4%LCG, aunque hubo una tendencia al incremento en esta última variable. Nuestros hallazgos están acordes con los reportados por Robinson *et al.* (1998) y Colin-Schoellen *et al.* (2007), quienes no encontraron efectos significativos en la producción de leche y proteína cuando las vacas fueron suplementadas con ambos AAP. En contraste, algunas investigaciones muestran que hay un efecto de los AA sobre la producción de leche y proteína en las vacas lecheras. (Socha *et al.*, 2008; Třináctý *et al.*, 2009; Zanton *et al.*, 2014).

La tendencia al incremento en la 4%LCG en el grupo MetLys ( $p=0.10$ ) puede ser explicado por el incremento en la disponibilidad de AA en la glándula mamaria, siendo una parte de estos AA usados en rutas metabólicas como síntesis de grasa. La Met es un importante AA y su diferencia a menudo sugiere estar relacionada a la producción de grasa de la leche porque su papel como un donador de grupos metilos en reacciones de transmetilación en la biosíntesis de lípidos (Bequette *et al.*, 2003) y la síntesis de colina para la síntesis de fosfolípidos



también. Se ha establecido que el 25% de la metionina consumida por la vaca lechera es destinada para la síntesis de estas dos moléculas. En un estudio fue encontrado que cuando la Met absorbable en intestino era deficiente, la síntesis de grasa se reducía (Campbell & Farrell, 2002).

#### *Composición de la proteína de la leche*

Es interesante observar en los resultados que la producción de proteína en la leche fue numéricamente mayor en las vacas alimentadas con AAP. A pesar de la falta de apoyo estadístico, el mejoramiento de esta respuesta en vacas alimentadas con AAP es consistente con otros estudios (Aldrich *et al.* 1993, Robinson *et al.* 1995, Kudrna *et al.* 2009). Estos resultados pueden ser un efecto directo del mejoramiento en el balance de AA en el intestino delgado, causando por lo tanto una mayor fuente de precursores para la síntesis de proteínas lácteas. Sin embargo, parece que la respuesta a la suplementación con AA varía debido a que los aminoácidos tienen muchas rutas metabólicas en el cuerpo del animal.

Los requerimientos en el primer tercio de la lactancia son destinados para la síntesis de lactosa y para la producción de la leche. En este estudio fue muy importante evaluar el efecto de la suplementación con AAP en vacas lecheras, sin balance energético negativo (BEN), es decir, evaluarlas en el segundo tercio de lactancia. Esto es importante, debido a que los AA suplementados son destinados para encontrar los requerimientos de energía cuando los animales están en BEN (Piepenbrink, 2004; Fatima *et al.* 2014) y por lo tanto, estos pueden no tener un efecto en la síntesis de componentes como grasa o proteína especialmente.

Aparentemente, este propósito fue logrado en el presente estudio aunque no fueron encontradas diferencias en la cantidad de proteína, si fue diferente en su composición.

Como se muestra en la tabla 2, la  $\alpha$ S1 y  $\beta$  caseínas fueron estadísticamente diferentes entre tratamientos, siendo mayor la cantidad producida en el grupo MetLys. Los datos están acordes con Třináčtý et al (2009), quien encontró diferencias significativas en las concentraciones de  $\beta$  y  $\alpha$  caseína, pero es imposible en este estudio decir si el cambio fue en la  $\alpha$ S1 o  $\alpha$ S2 caseína, porque no fueron evaluadas independientemente. En contraste, Pacheco-Ríos et al (1999) investigó el efecto de la metionina protegida en sistemas de pastoreo en Nueva Zelanda y encontró una disminución en la producción de  $\beta$  caseína solamente. Esto da un importante punto de análisis, porque acorde a estos resultados y los obtenidos en el presente experiment, se puede decir que los impactos generados por la adición de estos dos aminoácidos protegidos o por la MetP a la dieta, impacta o cambia el perfil de la proteína de la leche específicamente  $\alpha$  y  $\beta$  caseína. Un impacto en la kappa caseína no fue encontrado en ninguno de los estudios.

Nosotros consideramos que los cambios encontrados en las concentraciones de  $\alpha$ S1 y  $\beta$  caseína pueden ser explicados porque son la forma prevalente de las caseínas en la leche bovina (Swaisgood 1993),  $\alpha$ S1 y  $\beta$  representan el 37 y 35% respectivamente, mientras que la  $\alpha$ S2 y la kappa caseína solo son el 10 y 12 % (Treweek, 2012). Además, se ha reportado que la  $\alpha$ S1 caseína es una proteína que está involucrada en el transporte de las caseínas desde el retículo

endoplasmático hasta el aparato de Golgi, por lo cual su síntesis podría ser esencial para el transporte de las otras proteínas, lo cual significaría una mayor necesidad en su síntesis.

Una explicación a la falta de efecto de la suplementación con Met y Lys protegidas sobre la única proteína del suero de la leche medida puede ser debido a que cuando se compara el perfil de aminoácidos de las proteínas del suero de la leche con las caseínas, estas son más bajas en glutamate, prolina y metionina y más alta en cisteína, glicina y treonina que las caseínas (Davis et al, 1994); por lo que se podría pensar que incrementar el suministro de Lys y Met en el intestino delgado, no parece ser una estrategia apropiada para incrementar este tipo de proteínas lácteas. Actualmente, se ha publicado un estudio *in vitro*, en donde se suplemento Met y Lys a células de la glándula mamaria bovina en una relación 3:1 (la concentración de Lys y Met fue de 1.2 y 0.4 mM, respectivamente) y fueron encontrados efectos en la expresión de genes relacionados en la transcripción y traducción de las proteínas de la leche, como son CSN1S1, CSN1S2, CSN2, CSN3, LALBA, JAK2, STAT5, ELF5, mTOR, EIF4EBP1, lo cual condujo al mejoramiento en la síntesis de proteína, porque en esta relación, la producción de caseína fue incrementada (2.95 ppm) (Nan et al 2014). Es necesario considerar que los estudios *in vivo* pueden ser influenciados por muchos factores, que involucran órganos y tejidos y es más complejo encontrar respuestas más precisas. Sin embargo, nuestros resultados fueron similares a este estudio porque fueron encontrados incrementos significativos en la producción de la  $\beta$  y  $\alpha$ S1 caseína, sugiriendo que fue más alta la expresión de los genes CSN1S1 y CSN2.

## **Conclusiones**

La suplementación con metionina y lisina tendió a incrementar 4%LCG y modificó los perfiles de la proteína, incrementando los niveles de la alpha S1 y beta caseína, sin afectar el porcentaje de proteína.

## **Agradecimientos**

Los autores agradecemos a COLCIENCIAS por la beca de la estudiante de doctorado, CODI por la Fuente de financiación para el desarrollo de este estudio, Ajinomoto y Evonik por el suministro de los aminoácidos protegidos y la asistencia técnica. La facultad de Ciencias Agrarias por proporcionarnos los equipos para uso experimental y a Universidad de Antioquia por el apoyo de sostenibilidad 2014-2015

## **References**

**Aldrich JM, Muller LD & Varga GA** 1993 Effect of somatotropin administration and duodenal infusion of methionine and lysine on lactational performance and nutrient flow to the small intestine. *British Journal of Nutrition* **69** 49-58

**Amino Cow** 2007 The Mepron Dairy Ration Evaluator. Version 3.5.1. Degussa Corp., Hanau, Germany.

**Bequette BJ, Backwell FR & Crompton LA** 1998 Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *Journal of Dairy Science* **81** 2540-2559

**Bequette BJ & Nelson K** 2006 The Roles of Amino Acids in Milk Yield and Components. Ruminant Nutrition Symposium, Best Western Gateway Grand, Gainesville FL

**Bequette BJ, Lapierre H & Hanigan MD** 2003 Amino acid uptake by the mammary gland of lactating ruminants. In Amino Acids in Animal Nutrition [J.P.F. D'Mello, ed.] Wallingford: CABI Publishing, pp. 347-365.

**Bionaz M, Hurley W & Loor J** 2012 Milk Protein Synthesis in the Lactating Mammary Gland: Insights from Transcriptomics Analyses. In: Hurley, WL (ed.) Milk Protein. In TechOpen, Rijeka, Croatia, pp 285-324

**Bionaz M & Loor J** 2011 Gene Networks Driving Bovine Mammary Protein Synthesis During the Lactation Cycle. *Bioinformatics and Biology Insights* **5** 83–98

**Chanat E, Martin P & Ollivier-Bousquet M** 1999  $\alpha$ S1-casein is required for the efficient transport of  $\beta$ - and  $\kappa$ -casein from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus of mammary epithelial cells. *Journal of Cell Science* **112** 3399-3412

**Colin-Schoellen O, Laurent F, Vignon B, Robert J & Sloan B** 1995 Interactions of ruminally protected methionine and lysine with protein source or energy level in the diets of cows. *Journal of Dairy science* **78** 2807-2818

**Davis T, Nguyen H, Garcia-Bravo R, Fiorotto M, Jacksonz E & Reeds P** 1994 Amino acid composition of the milk of some mammalian species changes with stage of lactation. *British Journal of Nutrition* **72** 845-853

**Fatima A, Lynn DJ, O'Boyle P, Seoighe C & Morris D** 2014 The miRNAome of the postpartum dairy cow liver in negative energy balance. *BMC Genomics* **15** 279

**Haider SR, Reid HJ & Sharp BL** 2012 Tricine-SDS-PAGE. In *Protein Electrophoresis* (pp. 81-91). Humana Press.

- Hanigan MD, Bequette BJ, Crompton LA & France J** 2001 Modeling mammary amino acid metabolism. *Livestock Production Science* **70** 63–78
- Hermann Schägger** 2006. Tricine SDS PAGE. *Nature Protocols*. **1** 16 – 22
- Kim Y, Atalla H, Mallard B, Robert C & Karrow N** 2011 Changes in Holstein cow milk and serum proteins during intramammary infection with three different strains of *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research* **7** 51
- Kimball SR & Jefferson LS** 2006 New functions for amino acids: effects on gene transcription and translation. *The American Journal of Clinical Nutrition* **83** 500S-507S
- Kudrna V, Illek J, Marounek M & Nguyen A** 2009 Feeding ruminally protected methionine to pre- and postpartum dairy cows: effect on milk performance, milk composition and blood parameters. *Czech Journal Animal Science* **54** 9 395–402
- Lara A, Mendoza G, Landois L, Barcena R, Sánchez M, Rojo R, Ayala J & Vega S** 2006 Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livestock Science* **105** 105–108
- Leonardi C, Stevenson M & Armentano LE** 2003 Effect of Two Levels of Crude Protein and Methionine Supplementation on Performance of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* **86** 4033-4042
- Neville M** 2009 Introduction: Alpha-Lactalbumin, a Multifunctional Protein that Specifies Lactose Synthesis in the Golgi. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **14** 211–212
- Nan X, Bu, D, Li X, Wang J, Wei H, Hu H, Zhou L & Looor J** 2014. Ratio of lysine to methionine alters expression of genes involved in milk protein transcription and

translation and mTOR phosphorylation in bovine mammary cells. *Physiological Genomics* **46**: 268–275

**Phadungath C** 2005 Casein micelle structure: a concise review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **27** 201-212

**Pacheco-Rios D, McNabb C, Hill J, Barry T & Mackenzie D** 1999 The effects of methionine supplementation upon milk composition and production of forage-fed dairy cows. *Can. Journal Animal Science* **79** 235–241.

**Pardo M & Natalucci C** 2002 Electrophoretic Analysis (Tricine-SDS-PAGE) of Bovine Caseins. *Acta Farmacéutica Bonaerense* **21** 57-60

**Piepenbrink M, Marr A, Waldron M, Butler W, Overton T, Vázquez-Añón M and Polan CE, Cummins KA, Sniffen CJ, Muscato TV, Vicini JL, Crooker BA, Clark JH, Johnson D, Otterby DE, Guillaume B, Muller LD, Varga GA, Murray RA & Peirce-Sandner SB** 1991 Responses of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. *Journal of Dairy Science* **74** 2997–3013

**Reynolds CK, Harmon DL & Cecava MJ** 1994 Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. *Journal of Dairy Science* **77** 2787-2808

**Robinson P, Fredeen A, Chalupa W, Julien W, Sato H, Fujieda T & Suzuki H** 1995 Ruminally protected lysine or methionine for lactating dairy cows fed a diet designed to meet requirements for microbial and postruminal protein. *Journal of Dairy Science* **78** 582–594

**Robinson P, Chalupa W, Sniffen C, Julien W, Sato H, Watanabe K, Fujieda T & Suzuki H** 1998 Ruminally Protected Lysine or Lysine and Methionine for

Lactating Dairy Cows Fed a Ration Designed to Meet Requirements for Microbial and Postruminal Protein. *Journal of Dairy Science* **81** 1364–1373

**Robinson P** 2010 Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science* **127** 115-126.

**Samuelson DJ, Denise SK, Roffler R, Ax RL, Armstrong DV & Romagnolo DF** 2001 Response of Holstein and Brown Swiss cows fed alfalfa hay-based diets to supplemental methionine at two stages of lactation. *Journal of Dairy Science* **84** 917–928.

**SAS 2007** SAS/STAT Software. Version 9 ed. SAS Inst Inc, Cary, NC

**Schingoethe DJ, Byers FM & Schelling GT** 1988 Nutrient needs during critical periods of the life cycle. In: DC Church, editors. *The Ruminant Animal: Digestive, Physiology, and Nutrition*, Illinois: Waveland Press. Inc. pp 421-447

**Socha, MT, Schwab GC, Putnam DE, Whitehouse NL, Garthwaite BD, Ducharme GA** 2008 Extent of methionine limitation in peak-, early-, and mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science* **91** 1996–2010.

**Swaisgood HE** 1993 Symposium: Genetic perspectives on milk proteins. Comparative studies and nomenclature. Review and Update of Casein Chemistry. *Journal of Dairy Science* **76** 3054-3061

**Swanepoel N, Robinson PH, Erasmus LJ** 2010 Amino acid needs of lactating dairy cows: Impact of feeding lysine in a ruminally protected form on productivity of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* **157** 79–94



**Tay Eek-Poei & Gam Lay-Harn** 2011 Proteomics of human and the domestic bovine and caprine milk. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* **19** 45 – 53

**Titi H, Azzam S & Alnimer M** 2013 Effect of protected methionine supplementation on milk production and reproduction in first calf heifers. *Archiv Tierzucht* **56** 225-236

**Treweek T, Thorn D, Price W & Carver J** 2011 The chaperone action of bovine milk  $\alpha$ S1- and  $\alpha$ S2-caseins and their associated form  $\alpha$ S-casein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **510** 42–52

**Třináctý J, Křížová L, Richter M, Černý V & Říha J** 2009 Effect of rumen-protected methionine, lysine or both on milk production and plasma amino acids of high-yielding dairy cows. *Czech Journal Animal Science* **54** 6 239–248

**Treweek TM** 2012 Alpha-casein as a molecular chaperone. In W. L. Hurley (Eds.), *Milk Protein* Rijeka, Croatia, pp. 85-119.

**Vyas D & Erdman RA** 2009 Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. *Journal of Dairy Science* **92** 5011–5018

**Wit JN** 1998 Nutritional and Functional Characteristics of Whey Proteins in Food Products. *Journal of Dairy Science* **81** 597–608

**Zanton GI, Bowman GR, Vázquez-Añón M & Rode LM** 2014 Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. *Journal of Dairy Science* **97** 11 7085–7101

## CONCLUSIONES GENERALES

1. La metionina protegida, usada en este experimento tuvo una muy baja protección, por lo cual gran parte del aminoácido es degradado en el rumen y una menor cantidad paso a nivel intestinal. Caso contrario sucedió con la lisina, que aunque la protección ruminal funcionó muy bien, esta interfirió también en su digestibilidad intestinal. Esto trae como resultado, que el nivel de inclusión en la dieta sea mayor, porque las cantidades suplementadas deben ser mayores para poder compensar estos dos factores y que lleguen los aminoácidos metabolizables necesarios para cubrir las deficiencias. Mayor cantidad suplementada de aminoácidos, implica mayores costos en la producción de leche.

2. La suplementación con aminoácidos protegidos lisina y metionina incrementó la producción de proteína metabolizable, debido a que en una de sus fuentes, la proteína microbiana absorbible en el intestino delgado fue afectada significativamente por la suplementación.

3. Los resultados de este estudio sugieren que en algunos animales que presentaron bajos requerimientos, la suplementación con metionina y lisina protegidas no fueron necesarias, debido a que tienen balances positivos de Met y Lys. Animales con más bajos consumos de materia seca, sí podrían mejorar su balance con la suplementación de fuentes de aminoácidos protegidas o sin protección. Más estudios son necesarios para determinar si las vacas pueden responder a otros aminoácidos, que puedan estar limitando la producción de leche y síntesis de proteína en sistemas de pastoreo.

4. Para realizar balances de aminoácidos lo más exactos posibles para vacas lecheras usando los diferentes softwares, y específicamente el AminoCow, es necesario contar con información precisa y adecuada del consumo de MS del forraje y el consumo total de cada uno de los animales. Así como también son necesarios los datos sobre la producción de proteína microbiana.
  
5. La suplementación con aminoácidos protegidos en este estudio no afectaron la producción de leche y el porcentaje de proteína en leche. Sin embargo, si tuvo efectos significativos sobre el perfil de las proteínas lácteas.
  
6. El uso de la suplementación con metionina y lisina protegidas modificó significativamente la producción de alpha S1 y beta caseína. Estas caseínas parecen ser importantes debido a que contienen péptidos bioactivos que serían benéficos para la alimentación humana.
  
7. Es necesario pensar a futuro sobre cómo mejorar la relación Met:Lys en la dieta total, más que suplir específicamente estos dos aminoácidos debido a lo complejo de obtener información precisa de consumo y producción de proteína microbiana.