

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

TESIS DOCTORAL

**FERMENTACIÓ RUMINAL, DEGRADACIÓ  
PROTEICA Y SINCRONIZACIÓ ENERGÍA-PROTEÍNA  
EN TERNERAS EN CEBO INTENSIVO**

*Presentada por:*

**Aina Rotger Cerdà**

**Para acceder al grado de Doctor en el programa de Producción Animal de la**

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Ciència Animal i dels Aliments**

**Facultat de Veterinària**

*Bajo la direcció de:*

**Dr. Alfred Ferret Quesada**

**Alfred Ferret Quesada**, profesor titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

Certifica:

Que la memoria titulada “Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo” presentada por Aina Rotger Cerdà para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo su dirección y, considerándola concluida, autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste, firma la presente en Bellaterra,

Dr. Alfred Ferret Quesada

La autora de esta memoria ha disfrutado de una beca FI de la Generalitat de Catalunya, desde enero de 2001 hasta diciembre de 2004.

La realización de la presente memoria ha sido posible gracias al proyecto CICYT (AGL2000-0352) titulado “Optimización de la nutrición proteica de terneras alimentadas con raciones de bajo contenido en proteína”.

Diez reglas de la Buena Suerte para emprender con éxito una tesis doctoral y en general para emprender cualquier misión en la vida:

1. La suerte no dura demasiado tiempo, porque no depende de ti. La Buena Suerte la crea uno mismo, por eso dura siempre.
2. Muchos son los que quieren tener Buena Suerte, pero pocos los que deciden ir a por ella.
3. Si ahora no tienes Buena Suerte tal vez sea porque las circunstancias son las de siempre. Para que la Buena Suerte llegue, es conveniente crear nuevas circunstancias.
4. Preparar circunstancias para la Buena Suerte no significa buscar sólo el propio beneficio. Crear circunstancias para que otros también ganen atrae la Buena Suerte.
5. Si “dejas para mañana” la preparación de las circunstancias, la Buena Suerte quizá nunca llegue. Crear circunstancias requiere dar un primer paso... ¡Dalo hoy!
6. Aun bajo las circunstancias aparentemente necesarias, a veces la Buena Suerte no llega. Busca en los pequeños detalles circunstancias aparentemente innecesarias..., pero ¡imprescindibles!
7. A los que sólo creen en el azar, crear circunstancias les resulta absurdo. A los que se dedican a crear circunstancias, el azar no les preocupa.
8. Nadie puede vender suerte. La Buena Suerte no se vende. Desconfía de los vendedores de suerte.
9. Cuando ya hayas creado todas las circunstancias, ten paciencia, no abandones. Para que la Buena Suerte llegue, confía.
10. Crear Buena Suerte es preparar las circunstancias a la oportunidad. Pero la oportunidad no es cuestión de suerte o azar: ¡siempre está ahí!

Adaptado del libro “La Buena Suerte” de Álex Rovira Celma y Fernando Trías de Bes.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Alfred Ferret Quesada, que gracias a su prudencia y su buen hacer me dio confianza para enderezar el rumbo y llevar este barco a buen puerto. También quiero agradecer a los otros coautores de los artículos científicos, el Dr. Xavier Manteca, por su siempre buena disponibilidad, al Dr. José Luis Ruíz de la Torre por sus magistrales lecciones de Excel y al Dr. Sergio Calsamiglia, por sus valiosos comentarios tipo ‘reviewer JAS’ sobre los artículos.

Como no, agradecer a mis padres la inquietud por estudiar y querer siempre llegar un poquito más lejos y a mi hermana por motivarme a publicar los trabajos y que así en Google haya dos Rotger et al., uno en el campo de la producción animal y el otro en el campo de la medicina. Especialmente les agradezco la insistencia que nos dieron con el inglés, que a las dos Rotgers nos ha sido muy útil.

Después quiero agradecer a mis compañeros de fatigas, en especial a Anna Corbella y a los que colaboraron como estudiantes Pep, Lluís, Alba, Nuria y Jordina, y que aportaron muy buenos momentos y mucho más de los que se les pedía. Después a todos mis compañeros de doctorado, desde nutrición hasta la pecera, y en especial a los que continúan con la línea de terneros (Luciano, Vincent, Glauber) y a los que pasaron de compañeros a ser algo más (Ernesto, Elier, Irene, Adriana, Vanesa, Coni). También a todos los profesores que en un momento u otro se preocuparon por el trabajo realizado y aportaron su experiencia.

Después quiero agradecer a todo el personal de las Granjas y Campos Experimentales de la UAB dirigido por Ramón Costa, por permitirme librar algunos fines de semana y vacaciones, y por hacer de cowboys los días de pesada. Especialmente recordaré el buen humor matutino de Ricard y Ramón Sáez. También quiero agradecer a Rosa y a Blas por su colaboración en el laboratorio y a las eficientes secretarías del departamento.

También quiero agradecer a las terneritas que al acabar el experimento se fueron a Marineland: Penélope, Simpática, Torera, Bruta, Loca, Set, a las peques y a las 4 del experimento 3, que no fueron bautizadas pero sí muy bien aprovechadas, por amenizar los muestreos y llenarlos de sorpresas.

Y en último lugar, agradecer a la globalización por abrirme nuevos horizontes y a Lili, mi más fiel acompañante los fines de semana en la granja, las noches en los fermentadores y en el trabajo de ordenador.

**RESUMEN:** El sistema de producción de carne de vacuno en España es muy específico. Es un sistema totalmente desligado de la tierra, con animales sacrificados jóvenes y alimentados durante todo el engorde a base de piensos concentrados ricos en cereales, produciendo la característica carne rosada. En los últimos años, ha cobrado interés la inclusión de leguminosas grano en estas dietas, con el problema de que estos suplementos están relativamente poco caracterizados en estas condiciones alimentarias, ya que la degradabilidad de suplementos proteicos puede reducirse en dietas concentradas. Por otra parte, la cebada y el maíz son los cereales más utilizados y aunque tienen diferentes velocidades de degradación ruminal del almidón, se han realizado pocos esfuerzos para sincronizar su degradación con fuentes proteicas de similares características y así maximizar la eficiencia de la fermentación ruminal.

En el marco de la falta de información sobre la fermentación ruminal de terneros jóvenes alimentados con dietas concentradas nos planteamos los siguientes objetivos:

- a) Caracterizar la fermentación ruminal y la degradabilidad de la proteína de suplementos vegetales durante todo el engorde.
- b) Estudiar los efectos de la sincronización de la degradabilidad ruminal del almidón de la cebada y el maíz con dos fuentes proteicas, sobre la fermentación ruminal y sobre los parámetros productivos y el comportamiento de ingestión.

En el primer experimento con un diseño de medidas repetidas estudiamos como evolucionaba la fermentación ruminal y la degradación de la proteína de 4 suplementos vegetales (dos leguminosas y dos subproductos de la extracción de aceite) en 6 terneras en crecimiento entre los 80 y los 250 kg alimentadas con dietas concentradas con distinta proporción de fibra. Una dieta contenía un 12% de paja de cebada y la otra un 30% de alfalfa deshidratada, y ambas eran isoenergéticas e isoproteicas. Observamos que aunque en ambas dietas la actividad celulolítica, estimada a través de la degradación ruminal de la FND de una muestra de heno de alfalfa incubada *in situ*, era muy baja, fue ligeramente superior en la dieta que tenía mayor proporción de forraje. La dieta con un 30% de alfalfa deshidratada también presentó mayor degradabilidad ruminal de las dos leguminosas grano (guisante y altramuz) incubadas *in situ*. Con la edad aumentó la ingestión total de carbohidratos no fibrosos y la fermentación se volvió más amilolítica y proteolítica, aumentando la concentración de AGV totales, la proporción de propionato y la degradabilidad efectiva de la proteína de los suplementos incubados, a

excepción de la harina de soja. Estas mismas dietas se administraron en el segundo experimento a 4 terneras de 300 kg de peso vivo, asignadas a un diseño de cross-over para estudiar el efecto del nivel de fibra de la dieta sobre la fermentación ruminal y la degradación proteica de 7 suplementos proteicos de origen vegetal en la última fase de engorde. El perfil de fermentación ruminal no se vio afectado por el nivel de fibra de la dieta, siendo un perfil básicamente amilolítico. La degradación de la FND del heno de alfalfa también fue muy baja (25,5%) y la degradación de las leguminosas grano fue más baja que los valores aportados por los sistemas de referencia, siendo los valores obtenidos más adecuados para estas condiciones de producción. Los valores de degradación de la harina de soja y la harina de girasol fueron similares a los aportados por las tablas de referencia, sin verse afectados por el nivel de fibra de la dieta.

Para el estudio de la sincronización de la degradabilidad ruminal entre fuentes de energía y de proteína, combinamos la cebada y el maíz con dos fuentes proteicas, harina de soja y harina de girasol, que demostraron tener diferente velocidad de degradación ruminal en los experimentos 1 y 2. De estas combinaciones resultó una dieta sincronizada para una fermentación rápida (cebada-girasol); una dieta sincronizada para una fermentación lenta (maíz-soja) y dos dietas desincronizadas con un componente de fermentación rápida y uno de fermentación lenta (cebada-soja y maíz-girasol). Las 4 dietas eran isoproteicas e isoenergéticas y con una relación forraje:concentrado cercana a 10:90. *In vitro*, con el sistema de fermentadores de doble flujo continuo observamos una potenciación de la fermentación ruminal por efecto de la sincronización, sin que se viera afectada por el pH ruminal que se mantuvo constante a 6,2 o fluctuante, 12 h a 5,8 y 12 h a 6,4, simulando una acidosis crónica, frecuente en este tipo de dietas. *In vivo*, estas dietas fueron asignadas a 4 terneras de 132 kg en un diseño de cuadrado latino 4 x 4, sin observar ningún efecto de la sincronización sobre la fermentación ruminal ni sobre la digestibilidad de todo el tracto. El tipo de carbohidrato afectó a la ingestión, siendo mayor en los tratamientos que contenían maíz. Los animales que recibían la dieta sincronizada para una fermentación rápida (cebada-girasol) redujeron su ingestión y rumiaron durante más tiempo el forraje sin que sufrieran problemas de acidosis ruminal.

**SUMMARY:** Beef production in Spain is very specific. The production system is completely detached from the land and calves are fed high concentrate diets based on cereals from weaning to slaughtering at a young age, producing a tender and pink meat. The use of legume seeds in these high concentrate diets is increasing, although these protein supplements are poorly characterized in these feeding conditions and protein degradation can be reduced in such diets. Moreover, barley and corn are the main cereal grains used in high concentrate beef cattle diets. These cereals differ in their starch content and in their fermentation rate and extent of rumen degradation, but few efforts have been made to synchronize their degradation with protein supplements of similar degradation characteristics and maximize the efficiency of ruminal fermentation.

Due to the lack of information about ruminal fermentation in young beef cattle fed high concentrate diets, the following objectives were proposed:

- a) To characterize ruminal fermentation and estimate ruminal nitrogen degradability of plant protein supplements during the fattening period.
- b) To study the effects of synchrony of ruminal degradability of corn and barley starch with protein sources of different rates and extents of degradation, on ruminal fermentation, animal performance and feeding behavior.

In the first experiment, six Holstein heifers growing from 80 to 250 kg were used in a repeated measures trial to study the changes in ruminal fermentation and protein degradation of four plant protein supplements (two legume seeds and two by products from the oil industry). Heifers were fed two isoenergetic and isonitrogenous high concentrate diets with different fiber content. One diet contained 12% barley straw and the other 30% dehydrated alfalfa as forage source. Cellulolytic activity, estimated as NDF degradation of alfalfa hay incubated *in situ*, was very low in both diets, but it was slightly higher in the diet with 30% dehydrated alfalfa. *In situ* nitrogen degradability of legume seeds (peas and lupin seeds) was also higher in the diet with a higher proportion of forage. With age, gross nonstructural carbohydrate intake increased and ruminal fermentation became more amilolytic and proteolytic, increasing total VFA concentration, propionate proportion and nitrogen effective degradability of protein supplements, except for soybean meal. These two diets were assigned in the second experiment to four 300-kg growing heifers in a cross-over design to study the effect of dietary fiber level on ruminal fermentation and *in situ* nitrogen degradability of seven protein supplements (5 legume seeds) at the end of the fattening period. The ruminal fermentation pattern was basically amilolytic in both diets, and was not affected by



dietary fiber content. Neutral detergent fiber degradation of alfalfa hay was also very low (25.5%) and values of effective degradation on legume seeds were lower than values reported by reference feeding systems, the values obtained in the present experiment being more adequate for beef cattle fed high concentrate diets. Effective degradation of soybean meal and sunflower meal were similar to values reported by feeding systems and not affected by NDF content of diets.

To study the effects of synchrony of rumen degradability between energy and protein sources, barley and corn and two protein sources, soybean meal, SBM, and sunflower meal, SFM, differing in their rate and extent of rumen degradation were combined. This resulted in a synchronized rapid fermentation diet (barley-SFM), a synchronized slow fermentation diet (corn-SBM) and two unsynchronized diets with a rapidly and slowly fermenting component (barley-SBM and corn-SFM). All diets were isoenergetic and isonitrogenous with a forage to concentrate ratio close to 10:90. *In vitro*, with a dual flow continuous culture system, ruminal fermentation was enhanced in synchronized diets (Barley-SFM and corn-SBM). No effect of ruminal pH, which was held constant at 6.2 or fluctuant 12 h at 5.8 and 12 h at 6.4, simulating subclinical acidosis frequently associated with these diets, was observed. *In vivo*, these diets were fed to four 132-kg heifers assigned to a 4 x 4 Latin square design, but synchronization had no effect on ruminal fermentation or on apparent total tract digestibility. The type of carbohydrate affected intake, being higher for corn than barley based diets. Heifers fed the rapid synchronized diet (barley-SFM) reduced intake and increased time spent chewing per unit of forage intake, avoiding problems of ruminal acidosis.

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>CAPÍTULO 1: Revisión bibliográfica y objetivos</b>	Pág.
<b>1. Producción de carne de vacuno en España y en el mundo .....</b>	<b>1</b>
1.1. Censos y producciones mundiales .....	1
1.2. Comercio mundial .....	2
1.3. Producción en España .....	3
1.3.1. Animales cebados .....	4
1.3.2. Animales sacrificados .....	5
1.3.3. Política comunitaria .....	6
<b>2. Ecosistema ruminal .....</b>	<b>7</b>
2.1. Papel de los rumiantes en el mundo .....	7
2.2. Fermentación ruminal .....	8
2.3. Poblaciones ruminales .....	8
2.3.1. Bacterias .....	8
2.3.2. Protozoos .....	10
2.3.3. Hongos .....	11
2.4. Interrelaciones entre los microorganismos .....	12
2.5. Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas .....	12
<b>3. Desarrollo ruminal .....</b>	<b>13</b>
3.1. Fase de lactante o no rumiante .....	13
3.2. Fase de transición .....	14
3.2.1. Desarrollo anatómico .....	14
3.2.2. Desarrollo microbiológico .....	15
3.2.2.1. Inoculación y establecimiento de las bacterias .....	16
3.2.2.2. Inoculación y establecimiento de los protozoos ciliados .....	16
3.2.3. Diferenciación .....	17
3.2.3.1. Epitelial .....	17
3.2.3.2. Absorción y metabolismo .....	18
3.3. Fase de rumiante: consumo de alimento sólido.....	19
3.3.1. Sobre el desarrollo microbiológico .....	19
3.3.2. Sobre el desarrollo muscular y papilar.....	19
3.3.3. Sobre el desarrollo metabólico .....	21

	Pág.
3.4. Dietas de iniciación .....	22
3.5. Dietas concentradas .....	23
3.6. Capacidad fermentativa del rumen en desarrollo .....	24
<b>4. Fermentación en el rumen desarrollado .....</b>	<b>25</b>
<b>4.1. Degradación de carbohidratos .....</b>	<b>25</b>
4.1.1. Carbohidratos no fibrosos .....	26
4.1.2. Carbohidratos fibrosos .....	28
4.1.2.1. Proceso de degradación .....	29
4.1.2.2. Fibra efectiva .....	31
4.1.2.2.1. Fibra no forrajera .....	33
4.1.3. Degradación de los carbohidratos fibrosos en dietas concentradas ...	34
4.1.3.1. pH ruminal .....	35
4.1.3.1.1. Problemas de adhesión microbiana .....	35
4.1.3.1.2. Pérdida de potencial de membrana .....	35
4.1.3.1.3. Efecto tóxico de los AGV .....	36
4.1.3.2. Preferencia de los microorganismos ruminales por carbohidratos rápidamente degradables .....	37
4.1.3.3. Competencia por nutrientes esenciales .....	38
<b>4.2. Degradación de la proteína .....</b>	<b>39</b>
4.2.1. Clasificación de los compuestos nitrogenados que llegan al rumen ..	39
4.2.2. Proceso de degradación de los compuestos nitrogenados .....	41
4.2.2.1. Proteólisis .....	41
4.2.2.2. Peptidólisis .....	43
4.2.2.3. Metabolismo de aminoácidos .....	44
4.2.2.4. Degradación de compuestos nitrogenados no proteicos .....	45
4.2.2.4.1. Urea .....	45
4.2.3. Factores que afectan a la degradación proteica en el rumen .....	46
4.2.3.1. Factores relacionados con el alimento .....	46
4.2.3.1.1. Solubilidad .....	46
4.2.3.1.2. Estructura proteica .....	46
4.2.3.2. Condiciones ruminales .....	47
4.2.3.2.1. pH .....	47

	Pág.
4.2.3.2.2. Ritmo de paso y tiempo de retención ruminal .....	47
4.2.3.2.3. Concentración de productos finales de fermentación .....	48
4.2.3.3. Degradación proteica en dietas concentradas .....	49
4.2.4. Métodos de estimación de la degradabilidad proteica .....	49
4.2.4.1. <i>In vivo</i> .....	50
4.2.4.2. <i>In situ</i> .....	51
4.2.4.2.1. Interpretación de los valores de desaparición .....	55
4.2.4.2.2. Técnicas simplificadas .....	56
4.2.4.3. <i>In vitro</i> .....	56
4.2.4.3.1. Métodos de simulación de la fermentación ruminal .....	56
4.2.4.3.2. Métodos enzimáticos .....	57
4.2.4.3.3. Técnicas de inhibición <i>in vitro</i> .....	58
4.2.5. Estimación de la degradabilidad en los diferentes sistemas de alimentación .....	58
<b>5. Síntesis de proteína microbiana .....</b>	<b>59</b>
5.1. Aportes energéticos .....	60
5.2. Aportes nitrogenados .....	60
5.2.1. Amoníaco .....	60
5.2.2. Péptidos y aminoácidos preformados .....	62
5.3. Eficiencia de síntesis .....	63
5.3.1. Sincronía entre energía y proteína .....	64
5.3.2. Dietas concentradas .....	65
<b>6. Comportamiento de ingestión .....</b>	<b>66</b>
<b>7. Objetivos y planteamiento experimental .....</b>	<b>68</b>
<b>8. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>70</b>

## **CAPÍTULO 2: Trabajos experimentales**

**ARTÍCULO 1: Cambios en la fermentación ruminal y en la degradación proteica en terneras Holstein en crecimiento entre los 80 y los 250 kg alimentadas con dietas concentradas con distinta proporción de forraje y concentrado**

**Abstract .....** **89**

	Pág.
<b>1. Introduction .....</b>	<b>90</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>90</b>
2.1. Animals, diets and housing .....	90
2.2. Sample collection and analyses .....	92
2.3. Calculations .....	94
2.4. Statistical analyses .....	94
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>95</b>
3.1. Diet effect .....	95
3.2. Age effect .....	101
<b>4. Literature cited .....</b>	<b>104</b>

**ARTÍCULO 2: Degradabilidad ruminal de siete suplementos proteicos vegetales estimada *in situ* en terneras alimentadas con dietas concentradas con distinta proporción de forraje y concentrado**

<b>Abstract .....</b>	<b>111</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>112</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>112</b>
2.1. Animals, diets and housing .....	112
2.2. Body weight and feed intake .....	114
2.3. Ruminal sampling .....	114
2.4. <i>In situ</i> incubations .....	115
2.5. Feed refusals and supplements analyses .....	117
2.6. Calculations .....	117
2.7. Statistical analyses .....	117
<b>3. Results .....</b>	<b>118</b>
3.1. Animal performance .....	118
3.2. Ruminal fermentation .....	118
3.3. Degradation kinetics of plant protein supplements .....	121
3.4. Degradation kinetics of protein supplements corrected for loss of small particles .....	121
3.5. Degradation kinetics of alfalfa hay .....	121
<b>4. Discussion .....</b>	<b>123</b>

	Pág.
4.1. Ruminant fermentation .....	123
4.2. Degradation kinetics of plant protein supplements and alfalfa hay .....	124
<b>5. Conclusions .....</b>	<b>126</b>
<b>6. Literature cited .....</b>	<b>127</b>

**ARTÍCULO 3: Efectos de las fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína sobre la ingestión, digestibilidad aparente de todo el tracto y metabolismo ruminal estudiado *in vivo* e *in vitro* en dietas concentradas para terneros de engorde**

<b>Abstract .....</b>	<b>133</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>134</b>
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>134</b>
<b>2.1. <i>In vivo</i> trial .....</b>	<b>134</b>
2.1.1. Animals, diets and housing .....	134
2.1.2. Sample collection and analyses .....	135
2.1.3. Calculations .....	137
2.1.4. Statistical analyses .....	137
<b>2.2. <i>In vitro</i> trial .....</b>	<b>138</b>
2.2.1. Apparatus and experimental design .....	138
2.2.2. Sample collection and analyses .....	139
2.2.3. Statistical analyses .....	140
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>140</b>
3.1. <i>In vivo</i> trial .....	140
3.2. <i>In vitro</i> trial.....	145
<b>4. Literature cited .....</b>	<b>149</b>

**ARTÍCULO 4: Efectos de las fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína sobre el comportamiento de ingestión de terneras atadas y alimentadas con dietas concentradas**

<b>Abstract .....</b>	<b>157</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>158</b>

	Pág.
<b>2. Materials and Methods .....</b>	<b>158</b>
2.1. Animals, diets and housing .....	158
2.2. Data collection .....	159
2.3. Calculations .....	160
2.4. Statistical analyses .....	161
<b>3. Results and discussion .....</b>	<b>162</b>
<b>4. Literature Cited .....</b>	<b>170</b>
<b>CAPÍTULO 3: Discusión general de resultados</b>	
1. Parámetros productivos: crecimiento e ingestión .....	<b>177</b>
2. Fermentación ruminal .....	179
2.1. pH .....	179
2.2. Ácidos grasos volátiles .....	182
2.3. Amoníaco .....	183
3. Degradabilidad proteica ruminal de suplementos vegetales .....	185
4. Sincronización energía-proteína .....	187
5. Comportamiento de ingestión .....	187
6. Citas bibliográficas .....	188
<b>CAPÍTULO 4: Conclusiones finales .....</b>	<b>195</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
<b>CAPÍTULO 1: Revisión bibliográfica</b>	
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan (Yokohama y Johnson, 1988).....	9
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los principales protozoos ruminales con los sustratos de fermentación preferentes (Hungate, 1966) .....	11
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los carbohidratos (adaptado de Van Soest, 1982) .....	25
<b>Tabla 4.</b> Degradabilidad del almidón de varios cereales determinada mediante técnicas <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> o <i>in vivo</i> (adaptado de Nocek y Tamminga, 1991) .....	27
<b>Tabla 5.</b> Valores de fibra efectiva (porcentaje de FND-e sobre el total de FND del alimento) de concentrados y forrajes en función del tamaño de partícula, según las recomendaciones de CNCPS (Sniffen y col., 1992) .....	34
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la relación Forraje:Concentrado sobre la degradación proteica de suplementos vegetales incubados <i>in situ</i> .....	50
<b>Tabla 7.</b> Factores de estandarización de la técnica <i>in situ</i> por diversos autores (adaptado de Vanzant y col., 1998) .....	53
<b>CAPÍTULO 2: Trabajos experimentales</b>	
<b>ARTÍCULO 1</b>	
<b>Table 1.</b> Ingredient and chemical composition of diets .....	91
<b>Table 2.</b> Effects of diet and age on intake and NDF content of refusals .....	95
<b>Table 3.</b> Effects of diet and age on ruminal fermentation .....	97
<b>Table 4.</b> Effects of diet and age on nitrogen degradation of plant protein supplements .....	99
<b>Table 5.</b> Effects of diet and age on DM and NDF degradation of alfalfa hay .....	100
<b>ARTÍCULO 2</b>	
<b>Table 1.</b> Ingredient and chemical composition of diets .....	113
<b>Table 2.</b> Chemical composition as % of dry matter of plant protein supplements and alfalfa hay, and water soluble nitrogen of plant protein supplements, measured by the Weisbjerg test (true water solubility) and by zero time washing losses (%soluble N/total N) .....	116



	Pág.
<b>Table 3.</b> Effect of forage to concentrate ratio on ruminal fermentation .....	119
<b>Table 4.</b> Effect of forage to concentrate ratio on degradation constants of nitrogen of the plant protein supplements incubated <i>in situ</i> .....	122
<b>Table 5.</b> Comparison of the degradation constants of nitrogen of protein supplements incubated <i>in situ</i> , without correction and corrected for small particle loss .....	123
<b>Table 6.</b> Effect of forage to concentrate ratio on degradation constants of DM and NDF of alfalfa hay incubated <i>in situ</i> .....	124

### ARTÍCULO 3

<b>Table 1.</b> Composition of diets, on DM basis.....	136
<b>Table 2.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on intake and apparent total tract digestibility studied <i>in vivo</i> .....	141
<b>Table 3.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on ruminal fermentation studied <i>in vivo</i> .....	143
<b>Table 4.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on ruminal OM digestibility and N metabolism studied <i>in vitro</i> .....	146
<b>Table 5.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on total concentration and relative proportions of volatile fatty acids studied <i>in vitro</i> .....	148

### ARTÍCULO 4

<b>Table 1.</b> Description of the postural and the behavioral categories recorded .....	160
<b>Table 2.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on intake and feeding behavior .....	162
<b>Table 3.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on daily percentages of posture and behaviors <sup>a</sup> .....	164
<b>Table 4.</b> Effect of animal posture on daily percentages of behaviors <sup>a</sup> .....	165
<b>Table 5.</b> Effect of time postfeeding on daily percentages of posture and behavioral activities <sup>a</sup> .....	166
<b>Table 6.</b> Effect of diet on time spent eating, ruminating or total chewing per unit of DM and NDF from forage intake .....	167
<b>Table 7.</b> Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on daily percentages of other activities <sup>a</sup> .....	169

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO 1: Revisión bibliográfica</b>	Pág.
<b>Figura 1.</b> Censo de vacuno, en millones de cabezas, y producción de carne de vacuno, en millones de toneladas, de los principales países productores del mundo. Fuente: FAOSTAT 2003 en <a href="http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture">http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture</a> .....	1
<b>Figura 2.</b> Cambios en la producción de carne de vacuno al comparar dos periodos de 6 años, 1997-2002 vs. 1991-1996. En verde estan los aumentos y en marrón los descensos; cuanto más oscuro es el color, mayor es el cambio. Fuente: FAOSTAT 2003 <a href="http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture">http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture</a> .....	2
<b>Figura 3.</b> Distribución por provincias de los animales de cebo menores de 12 meses y los rebaños de vaca nodriza. Color más oscuro, mayor número de animales. Fuente: adaptado de IFCN Beef report, 2003 .....	5
<b>Figura 4.</b> Crecimiento del estómago de los terneros desde el nacimiento hasta las 17 semanas de edad, alimentados con sustituto de leche y con acceso a forrajes (Lyford, 1988) .....	15
<b>Figura 5.</b> Diagrama de la sección transversa de la pared ruminal totalmente desarrollada (Lyford, 1988) .....	18
<b>Figura 6.</b> Vías metabólicas de la degradación de carbohidratos fibrosos y no fibrosos ....	28
<b>Figura 7.</b> Representación esquemática de un desacoplador (XCOOH) y su habilidad para translocar protones a través de la membrana celular bacteriana, y el efecto tóxico de los AGV (XCOO <sup>-</sup> ) por acumulación, como respuesta a un gradiente de pH y por su incapacidad para atravesar la membrana celular (adaptado de Russell y Wilson, 1996) .....	36
<b>Figura 8.</b> Degradación y fermentación de los compuestos nitrogenados que llegan al rumen ( $k_d$ , ritmo de degradación; $k_p$ , ritmo de paso) y síntesis de proteína microbiana .....	40
<b>Figura 9.</b> Curva de degradación exponencial, típica de la mayoría de suplementos proteicos. ....	55
<b>Figura 10.</b> Componentes del comportamiento de ingestión y sus interacciones. Las medidas de los vértices son las primarias, y las derivadas localizadas en los lados del triángulo se pueden calcular a partir de las dos medidas primarias que conectan (Adaptado de Nielsen, 1999) .....	67

<b>CAPÍTULO 2: Trabajos experimentales</b>	Pág.
<b>ARTÍCULO 1</b>	
<b>Figure 1.</b> Ruminal pH (a), total VFA concentration (b), and concentration of ruminal NH <sub>3</sub> N (c) with time after feeding in 12:88 and 30:70 diets, represented as dotted line and solid line, respectively. Diet x time after feeding interactions were $P = 0.902$ for pH; $P = 0.744$ for total VFA concentration and $P = 0.003$ for NH <sub>3</sub> N concentration .....	98
<b>Figure 2.</b> Effect of age (13, 27, and 41 wk) and diet (12:88 and 30:70, forage to concentrate ratio) on NDF concentration in offer and refusals .....	101
<b>Figure 3.</b> Ruminal pH (a), total VFA concentration (b), and concentration of ruminal NH <sub>3</sub> N (c) with time after feeding at 13, 27, and 41 wk of age, represented as dotted line, dashed line and solid line, respectively. Age x time after feeding interactions were $P < 0.001$ for ruminal pH; $P = 0.093$ for total VFA concentration and $P = 0.405$ for ruminal NH <sub>3</sub> N concentration .....	102
<b>ARTÍCULO 2</b>	
<b>Figure 1.</b> Ruminal pH (a), total VFA concentration (b), and concentration of ruminal ammonia nitrogen (c) with time after feeding in 12:88 and 30:70 diets, represented as dotted line and solid line, respectively .....	120
<b>ARTÍCULO 3</b>	
<b>Figure 1.</b> Ruminal pH (a), total VFA concentration (b) and concentration of ruminal ammonia nitrogen (c) with time after feeding in dietary treatments. Barley-SBM, blue; Barley-SFM, green; Corn-SBM, red; Corn-SFM, yellow. Diet x time after feeding interactions were $P = 0.316$ for ruminal pH; $P = 860$ for total VFA concentration and $P < 0.001$ for ammonia nitrogen concentration .....	144
<b>CAPÍTULO 3: Discusión general de resultados</b>	
<b>Figura 1.</b> Ajuste lineal del consumo de materia seca en función del peso vivo .....	178
<b>Figura 2.</b> Ajuste lineal del pH ruminal en función del consumo de MS (a), del peso vivo (b), y de la concentración de AGV (c) .....	181

## **CAPÍTULO 1**

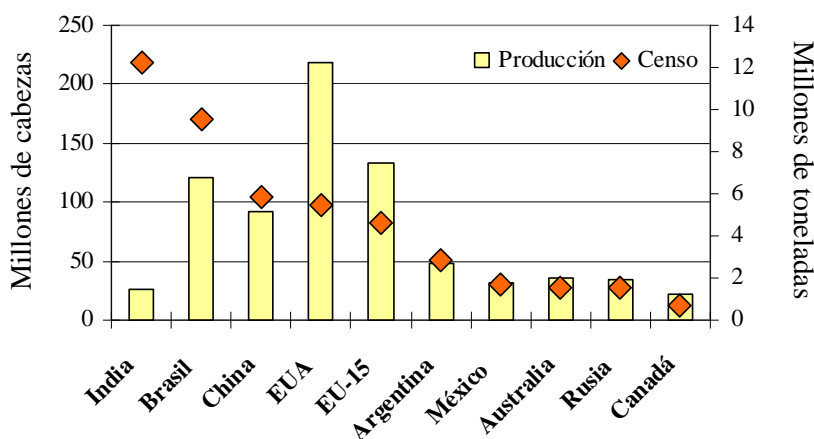
### **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## 1. Producción de carne de vacuno en España y en el mundo

Hoy en día la producción de carne de vacuno debe entenderse dentro de un contexto internacional, debido a las diferentes y complejas interacciones que se dan entre los mercados y sus componentes. Para el caso de España, este marco está determinado por la Unión Europea, sus países miembros y la relación de ésta con terceros países. Sin embargo, España presenta una serie de características bien diferenciadas del resto de Europa, en cuanto a su sistema de producción y a la carne producida.

### 1.1. Censos y producciones mundiales

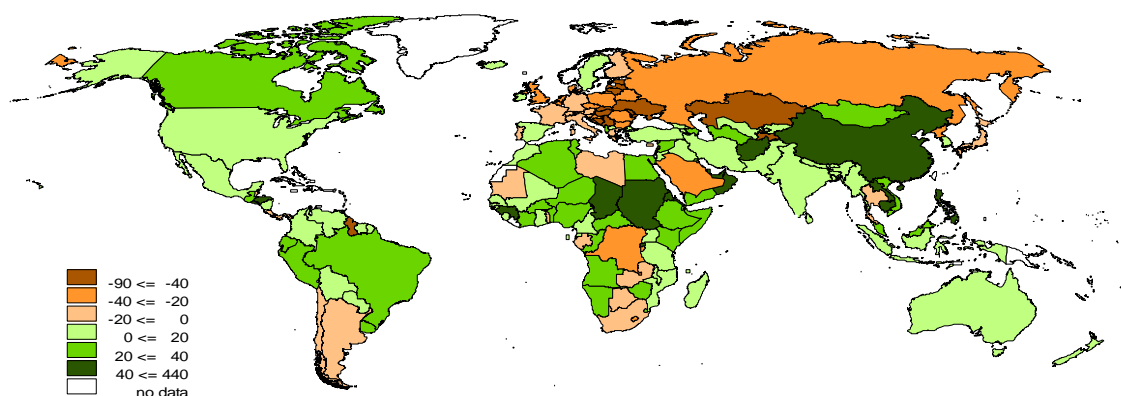
El censo de vacuno mundial para el periodo (2000-2002), incluyendo búfalos, fue aproximadamente de 1,35 billones de cabezas. El 70% de este censo se concentra en Sudamérica (23%), el Sur de Asia (20%), África (15%) y el Lejano Oriente (11%). Estas zonas de mayor censo, no coinciden con las de mayor producción, concentrándose casi el 60% de la producción en América del Norte (24%), Sudamérica (21%) y la Europa de los 15, EU-15, (13%). Resaltan la baja productividad de la India, que con un 16% del censo sólo representa el 5% de la producción mundial, y la gran productividad de Estados Unidos (EUA) y de la UE-15, que con un 7 y 6 % del censo producen el 22 y el 13 % de la producción mundial, respectivamente (Figura 1). La población de búfalos representa el 11% del censo y está localizada mayoritariamente en India, Pakistán y China (IFCN Beef report, 2003).



**Figura 1.** Censo de vacuno, en millones de cabezas, y producción de carne de vacuno, en millones de toneladas, de los principales países productores del mundo. Fuente: FAOSTAT 2003 en <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>.

En la UE-15, el 56% de la carne de vacuno se produce en Francia, Alemania e Italia. España, con el 8,5% de la producción neta está en quinto lugar (Libro Blanco, 2003).

Al observar la evolución de la producción mundial de la carne de vacuno en la última década (Figura 2), hay que destacar a China, como el país que ha experimentado un mayor crecimiento, doblando su producción; en América ha aumentado la producción en todos los países a excepción de Argentina y Chile; en África algunos países han aumentado y otros han disminuido su producción, con poca repercusión en el ámbito mundial. En el continente europeo la producción ha descendido dramáticamente en los países del Este a raíz de los últimos cambios políticos. Igualmente en la EU-15 la producción ha descendido, siendo este descenso más marcado en Gran Bretaña (-25%). Se destaca un aumento en la producción en España (19%), Irlanda (8%) y Suecia (5%).



**Figura 2.** Cambios en la producción de carne de vacuno al comparar dos periodos de 6 años, 1997-2002 vs. 1991-1996. En verde están los aumentos y en marrón los descensos; cuanto más oscuro es el color, mayor es el cambio. Fuente: FAOSTAT 2003 en <http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>.

## 1.2. Comercio mundial

En el ámbito mundial, tanto las exportaciones como las importaciones están en manos de pocos países. Los principales países exportadores son los EUA, el primer productor mundial, con el 30% de las exportaciones; seguido de Australia, con el 20% y Canadá con el 11% (promedio de los años 1999-2001; IFNC beef report, 2003).

Las exportaciones de la UE-15 a terceros países representan el 5% de las exportaciones mundiales, si se incluyera el mercado intracomunitario representarían el 33%. En los últimos años (1996-2002) debido a cambios en la política europea, han disminuido las ayudas a la exportación, y por ende las cantidades totales exportadas. El país más exportador en el año 2000 fue Irlanda (38% del total), seguido de Alemania (22%). España, con el 4,2% de las exportaciones está en sexto lugar (Libro Blanco, 2003).

Japón es el mayor importador neto del mundo, con un 27% de las importaciones mundiales, principalmente comprando carne de gran calidad. En segundo lugar están los EUA (20%), que importan mayoritariamente de Australia, Nueva Zelanda y Canadá carne de baja calidad para picar. En tercer lugar está la UE-15 (7%), donde las importaciones se han mantenido constantes los últimos años, siendo los principales importadores Reino Unido, Alemania e Italia.

Dentro del marco de la Unión Europea, España ha pasado de ser un importador neto, a equilibrar el balance y desde mediados de los noventa es un país exportador. Esto se ha debido, entre otras razones, al desarrollo de un sistema de cebo de animales altamente tecnificado, competitivo y con unos costes muy ajustados. En el 2000, España exportó un 20% de su producción, mayoritariamente a Francia, Italia y Portugal, dentro de la UE y fuera de ésta a Rusia. En animales vivos continua la tendencia a importar terneros jóvenes para cebo, principalmente de Francia, Irlanda, Alemania y Polonia. Mientras que las exportaciones de animales vivos se dirigen principalmente hacia Italia, país que demanda animales de buena calidad y pesos altos. En los últimos años se han incrementado las exportaciones hacia países como el Líbano.

### **1.3. Producción en España**

Las características propias de la ganadería de vacuno, junto con las limitaciones climatológicas de nuestro país, han condicionado el desarrollo de un modelo ganadero específico, diferente al de la Europa húmeda donde son frecuentes las explotaciones de ciclo cerrado. En nuestro país, mayoritariamente las fases de cría y cebo se dan en explotaciones diferentes, separadas geográficamente, por lo que hay un importante movimiento de animales vivos entre explotaciones.

En el año 2002, el sector vacuno representó el 6,7% de la producción final agraria, y el 18,3% de la producción final ganadera, ocupando el segundo lugar después del porcino (Libro Blanco, 2003).

### 1.3.1. Animales cebados

Aproximadamente, de los 3 millones de terneros que se ceban en España, se estima que el 50% son machos y hembras pasteros provenientes de los rebaños de vaca nodriza españoles (la vaca nodriza representa el 64,64% del censo de vacas mayores de 2 años, siendo España el único país europeo donde el censo de vaca nodriza supera al de vaca de leche). Estos terneros se crían en condiciones extensivas con la madre hasta los 5-6 meses de edad y después son cebados en condiciones intensivas a base de pienso y paja hasta el sacrificio, aproximadamente al año de edad. Un 20% de los terneros de cebo provienen de los rebaños lecheros (35,36% del censo de vacas mayores de 2 años) de la cornisa cantábrica y en su mayoría son machos frisones que entran en los cebaderos aproximadamente a las 3 semanas de edad como mamones, y después del destete, aproximadamente a las 13 semanas, pasan a cebarse a base de pienso y paja hasta el sacrificio antes del año de edad. Un 23% de los terneros cebados es ganado importado en forma de mamones y pasteros, mayoritariamente de Francia, Irlanda, Alemania y Polonia (MAPA, 2004). El 7% restante se estima que es engordado en las explotaciones de nacimiento.

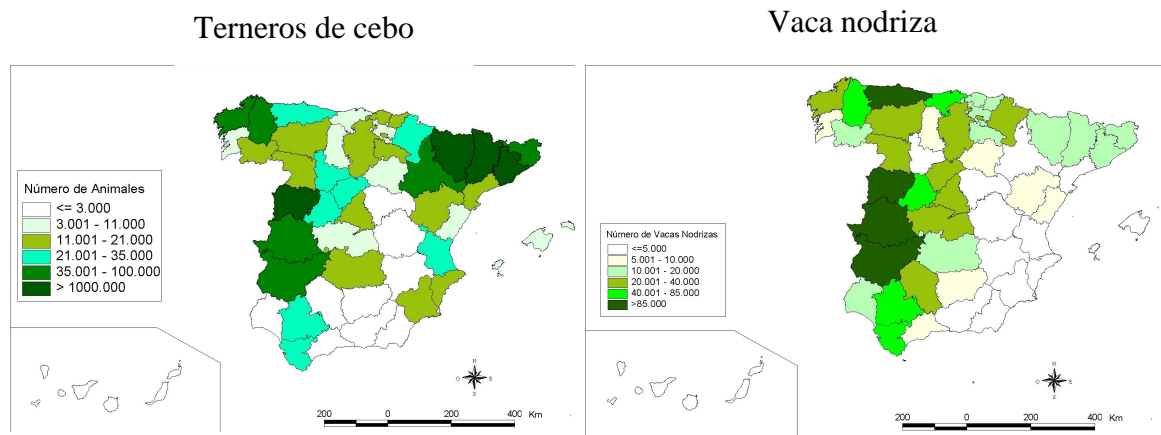
El sistema de producción de carne en España tiene dos partes muy diferenciadas, el de vaca nodriza, extensivo o sistema de cría que proporciona terneros, y el de cebo intensivo. Aunque son muy diferentes y están separados geográficamente, depende el uno del otro.

Los rebaños de vaca nodriza se localizan mayoritariamente en el oeste peninsular, y según los datos del censo agrario de 1999, el 80% del censo de vacas nodrizas se localiza en las Comunidades Autónomas de Castilla-León, Extremadura, Andalucía, Galicia y Asturias. El sistema es extensivo y las principales razas dedicadas a esta actividad cárnica son autóctonas (Avileña, Gallega, Asturiana, Morucha, Pirenaica...), que suelen cruzarse con machos cárnicos (Charolais, Limousine) para mejorar la conformación de los terneros y aumentar la producción de carne. Por el contrario, los cebaderos se localizan cerca de los grandes núcleos de consumo (Madrid y Barcelona) o de las grandes zonas cerealistas. El 76% de la producción total de carne de vacuno se concentra en las Comunidades Autónomas de Cataluña, Castilla-León, Galicia, Castilla-La Mancha y Aragón (Figura 3).

Las explotaciones de vaca nodriza cuentan con una importante base territorial y regímenes de producción extensivos o semi-extensivos. La alimentación se basa en el consumo de forrajes o pastos producidos en la propia explotación y se suplementan



puntualmente. En este subsector existe un bajo nivel de uso de tecnología, tanto en materia de alimentación, como en materia de reproducción y selección. A diferencia de lo anterior, en los cebaderos el régimen de producción es mucho más intensivo y desligado de la tierra. La alimentación se basa en piensos concentrados muy ricos en cereales, siendo el precio del cereal uno de los factores más determinantes en los costes generales de la explotación. En este subsector, el nivel tecnológico empleado en la alimentación y en el manejo de los animales es uno de lo más altos y avanzados de Europa.



**Figura 3.** Distribución por provincias de los animales de cebo menores de 12 meses y los rebaños de vaca nodriza. Color más oscuro, mayor número de animales. Fuente: adaptado de IFCN Beef report, 2003.

Este sistema de producción a base de piensos ricos en cereales y sacrificio a edad temprana, produce la denominada “carne rosada”, de gran aceptación en España. El consumo nacional medio de carne vacuna es de 11-12 kg por habitante y año, por debajo de la media europea (20 kg) y por debajo de las carnes de porcino o pollo.

### 1.3.2. Animales sacrificados

Los toros o añojos son la categoría que más se sacrifica en España, representan el 50% de las cabezas sacrificadas y el 54% de la carne producida. Están seguidos por las novillas, que representan el 28% de las cabezas sacrificadas, y en menor proporción por el vacuno mayor (13%) y menor (10%), siendo el sacrificio de bueyes prácticamente inexistente en España (fuente MAPA 2001, 2002).

Si se observan las categorías de sacrificio de las estadísticas agrarias, no se puede saber donde se incluye exactamente la carne rosada. Según la definición de Balasini (1972), son animales jóvenes de menos de un año de edad, y con un peso vivo entre 300 y 350 kg, que después del destete se alimentan a base de piensos compuestos, adquiriendo un crecimiento máximo y una carne rosada, muy tierna y succulenta.

### **1.3.3. Política comunitaria**

La Unión Europea ha venido diseñando una política agrícola comunitaria (PAC) de acuerdo a sus necesidades de consumo, el equilibrio social en zonas rurales, los compromisos con la organización mundial del comercio y los requerimientos de los consumidores. Para esto, ha diseñado una serie de herramientas como las primas al sacrificio, primas especial para el bovino macho, y a la vaca nodriza. Estas primas han tenido como objetivo incentivar la producción para asegurar un volumen estable, mantener el “paisaje rural” y sostener la producción en zonas marginales.

Sin embargo, recientemente esta política ha sido revisada y se han introducido una serie de cambios denominados “La Reforma Intermedia de la PAC”, cuyo objetivo es incentivar la producción en términos de respeto al medio ambiente y al bienestar animal, y mejorar la calidad de la cadena de producción y procesamiento. De la misma forma, se ha dejado la libertad para que los estados miembros desacoplen parcial o totalmente las ayudas de la producción, de tal manera que los mercados intra y extra comunitarios puedan operar de una forma mas competitiva, desligados de esquemas subsidiados. Para el caso español, se desacopla parcialmente la prima al sacrificio, se desacopla por completo la prima especial al bovino macho y se mantiene acoplada la prima a la vaca nodriza.

Por otra parte, la incorporación de nuevos estados miembros (UE-25) presupone un aumento en la capacidad productiva de la región que hasta el momento no se ha dado. Con los actuales precios de compra de terneros y venta de animales cebados, no es atractiva la producción de carne vacuna en estos países. Los nuevos estados miembros tienen la capacidad de ofrecer aumentos en el consumo por un lado, mano de obra y tierra a bajo costo por otro, y una estructura productiva sin serias limitaciones medioambientales.

Como se observa, España tiene un papel destacado en la producción mundial, con un sistema de cebo muy competitivo, con clara vocación de mercado y con capacidad

exportadora y que, por las características climatológicas y por el tipo de carne que se consume, es muy diferente del resto de Europa. El sistema de producción, que en el marco de esta revisión más nos interesa, es el de los ‘mamones’. Terneros provenientes de rebaños lecheros destetados tempranamente y que durante toda su vida se alimentan con piensos concentrados, ricos en cereales. A continuación, se describirá brevemente el ecosistema ruminal y como se desarrolla el rumen de estos animales desde el nacimiento hasta el pleno funcionamiento durante su ciclo de producción.

## **2. Ecosistema ruminal**

### **2.1. Papel de los rumiantes en el mundo**

Como se ha visto en la distribución mundial de los censos y producciones de vacuno, el ganado vacuno es de especial importancia en regiones desfavorecidas gracias a su capacidad de transformar pastos de baja calidad, ricos en pared vegetal y no aprovechables para el hombre ni otros animales no rumiantes, en proteína de alta calidad. La celulosa (polímero de glucosa unidas por enlaces  $\beta$  1-4) es el carbohidrato más abundante del mundo, y su reciclaje depende de la actividad microbiana (Van Soest, 1982). Los rumiantes han adaptado su tracto gastro-intestinal anterior para poder degradar la celulosa a través de una simbiosis con poblaciones microbianas y poder aprovechar al máximo los productos de fermentación formados. Al localizarse el rumen anterior al intestino delgado, se pueden aprovechar la masa microbiana sintetizada a partir de la fermentación vegetal, a diferencia de otros herbívoros que fermentan la celulosa en el tracto gastro-intestinal posterior.

Aunque la degradación de la celulosa, es uno de los mayores beneficios de la fermentación ruminal, en los países de mayor productividad, este beneficio ha pasado a ser secundario. Después de la II Guerra mundial, los cereales se volvieron una fuente de energía barata para los rumiantes y en los países desarrollados se empezaron a incluir grandes cantidades de cereal en los piensos. De esta manera se obtenían mayores velocidades de crecimiento y se podía desligar la producción de la tierra y del pastoreo. Los cereales fermentan rápidamente y esta fermentación va asociada con una disminución en el pH ruminal, lo que conllevará una disminución de la celulolisis. La mayor ventaja de la simbiosis ruminal, pasa a un segundo plano, siendo este el caso de la producción intensiva en España.

## 2.2. Fermentación ruminal

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica. La población microbiana se mantiene al ingerir y masticar alimentos con regularidad, añadiendo tampones y eliminando los ácidos producidos, arrastrando los residuos alimenticios no digeribles y los productos microbianos, y manteniendo unas condiciones apropiadas de pH, temperatura y humedad para el crecimiento microbiano. Estos microorganismos dependen del rumiante para disponer de las condiciones óptimas para su crecimiento, y el rumiante depende de los productos de fermentación anaeróbica del alimento fibroso que ingiere y de la actividad biosintética microbiana, para cubrir sus propias necesidades nutritivas (Yokohama y Johnson, 1988). El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los ácidos grasos volátiles (AGV), sin embargo, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, también los hay de inútiles como el metano, o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos (Owens y Goetsch, 1986).

## 2.3. Poblaciones ruminales

La mayoría de microorganismos presentes en el rumen funcional son anaeróbicos estrictos, y estos pueden ser bacterias, protozoos u hongos. El número relativo de las diferentes especies dependerá de la composición y estructura de la dieta, así como de las múltiples interacciones entre ellos (Ørskov, 1992).

### 2.3.1. Bacterias

En el rumen se encuentran entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  bacterias/g de contenido ruminal. Estas bacterias se pueden agrupar en 32 géneros y 63 especies, de las cuales 16 géneros y 28 especies se consideran funcionalmente importantes en términos de número y metabolismo (Yokohama y Johnson, 1988). Son el grupo de microorganismos más abundante, representan aproximadamente la mitad de la biomasa ruminal y una mayor proporción de la actividad metabólica ruminal, que está inversamente relacionada con el tamaño del microorganismo (Ørskov, 1992).

Las bacterias se pueden clasificar en función del sustrato que utilizan, de los productos formados o de sus requerimientos nutricionales. En función de su principal sustrato de fermentación, se pueden clasificar en microorganismos que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina o

lípidos. En una clasificación más extensa, se puede incluir el grupo de bacterias productoras de metano, de amoniaco y bacterias con actividad ureasa (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan (adaptado de Yokohama y Johnson, 1988).

<p><b>Principales especies celulolíticas</b></p> <p><i>Fibrobacter succinogenes</i>  <i>Ruminococcus flavefaciens</i>  <i>Ruminococcus albus</i>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i></p>	<p><b>Principales especies proteolíticas</b></p> <p><i>Ruminobacter amylophilus</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Streptococcus bovis</i></p>
<p><b>Principales especies hemicelulolíticas</b></p> <p><i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Ruminococcus sp.</i></p>	<p><b>Principales especies utilizadoras de lípidos</b></p> <p><i>Anaerovibrio lipolytica</i>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Treponema bryantii</i>  <i>Eubacterium sp.</i>  <i>Fusocillus sp.</i>  <i>Micrococcus sp.</i></p>
<p><b>Principales especies pectinolíticas</b></p> <p><i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Lachnospira multiparus</i>  <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>  <i>Treponema bryantii</i>  <i>Streptococcus bovis</i></p>	<p><b>Principales especies productoras de metano</b></p> <p><i>Methanobrevibacter ruminantium</i>  <i>Methanobacterium formicicum</i>  <i>Methanomicrobium mobile</i></p>
<p><b>Principales especies amilolíticas</b></p> <p><i>Ruminobacter amylophilus</i>  <i>Streptococcus bovis</i>  <i>Succinomonas amylolytica</i>  <i>Prevotella ruminicola</i></p>	<p><b>Principales especies productoras de amoniaco</b></p> <p><i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Megasphaera elsdenii</i>  <i>Selenomonas ruminantium</i></p>
<p><b>Principales especies utilizadoras de azúcares</b></p> <p><i>Treponema bryantii</i>  <i>Lactobacillus vitulinus</i>  <i>Lactobacillus ruminus</i></p>	<p><b>Principales especies ureolíticas</b></p> <p><i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>  <i>Selenomonas sp.</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Ruminococcus bromii</i>  <i>Butyrivibrio sp.</i>  <i>Treponema sp.</i></p>
<p><b>Principales especies utilizadoras de ácidos</b></p> <p><i>Megasphaera elsdenii</i>  <i>Selenomonas ruminantium</i></p>	

Esta clasificación no es absoluta, debido a que las bacterias se pueden especializar mucho, poco o nada en cuanto al tipo de sustrato que fermentan y la mayoría de ellas tienen la capacidad de degradar varios sustratos. Por ejemplo, la actividad proteolítica se ha descrito en el 38% de las bacterias ruminales, por lo que bacterias pertenecientes a otros grupos, pueden degradar la proteína (Yokohama y Johnson, 1988). Al haber

especies que se superponen en la utilización de un determinado sustrato, aumenta la eficacia de utilización de dicho sustrato y al ser ésta una población diversa, la fermentación será más estable, evitándose grandes fluctuaciones en las cantidades y proporciones de los productos finales formados (Yokohama y Johnson, 1988).

Otra clasificación bacteriana, es la que se hace en función de la fase física a la que se encuentran asociadas dentro del rumen. Aproximadamente el 75% de las bacterias se encuentran asociadas a las partículas de alimento y son las responsables, en mayor parte, de la degradación ruminal del alimento (Ørskov, 1992); un segundo grupo bacteriano más inespecífico, se encuentra asociado a la fase líquida y está formado por las bacterias que se han soltado de las partículas y poblaciones con altos ritmos de división que subsisten a partir de nutrientes solubles en el líquido ruminal. Finalmente, un tercer grupo de bacterias anaeróbicas facultativas adheridas al epitelio ruminal. Estas bacterias asociadas al epitelio ruminal consumen rápidamente el oxígeno que entra con el alimento y el agua, y están especializadas en degradar las células epiteliales sin intervenir activamente en la degradación del sustrato. También tienen gran actividad proteasa y ureasa, mediante la cual intervienen en el reciclaje de urea proveniente del torrente sanguíneo (Cheng y Costerton, 1980).

### 2.3.2. Protozoos

Los protozoos constituyen el grupo microbiano con el papel más controvertido en el rumen. El número de protozoos es de  $10^5$ - $10^6$  células/ml de contenido ruminal, siendo la mayoría especies ciliadas. Se pueden clasificar en dos subclases, *Entodiniomorfa*, y *Holotrica*, (Hungate, 1966) (Tabla 2). Los protozoos pueden no estar presentes en el rumen o llegar a representar el 2% del peso del contenido ruminal, el 40% del nitrógeno microbiano total y proporcionar el 60% de los productos de fermentación microbiana. Sin embargo, su contribución al flujo duodenal es mínima debido a tiempos de generación lentos y a una alta retención ruminal mediante su adhesión a las partículas de alimento o, en el caso de los holotricos, a la pared reticular durante los intervalos entre comidas (Abe y col., 1981).

Aunque los protozoos constituyen una parte integral de la población microbiana y tienen un papel importante en la fermentación, su beneficio para los rumiantes sigue siendo controvertido. Algunos estudios han demostrado que los protozoos aumentan la digestibilidad ruminal y el rendimiento de los animales, mientras que otros estudios no han observado ninguna diferencia entre animales defaunados y faunados. Ante esta

aparente contradicción, otros autores han atribuido a los protozoos una función de estabilización de la fermentación, controlando el nivel de nutrientes y asegurando una fermentación más uniforme durante los periodos entre comidas, evitando así grandes fluctuaciones de pH (Ørskov, 1992).

**Tabla 2.** Clasificación de los principales protozoos ruminales con los substratos de fermentación preferentes (Hungate, 1966).

Subclase	Género	Substrato fermentado
<i>Holotrica</i>		
	<i>Isotrica</i>	Almidón y azúcares
	<i>Dasytrica</i>	Almidón y azúcares
<i>Entodiniomorfa</i>		
	<i>Entodinium</i>	Almidón
	<i>Epidinium</i>	Almidón y hemicelulosa
	<i>Ophryoscolex</i>	Almidón
	<i>Diplodinium</i>	Celulosa
	<i>Eudiplodinium</i>	Celulosa
	<i>Polyplastron</i>	Celulosa

### 2.3.3. Hongos

Se descubrió su presencia en el rumen en los años 70. Anteriormente la fase móvil o zoosporo era confundida con un protozoo flagelado y la fase vegetativa o esporangio, siempre adherida a las partículas de fibra, no era identificada al estudiar el filtrado de líquido ruminal (Ørskov, 1992). Los géneros más frecuentes en el rumen son *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces* y *Orpinomyces* (Van Soest, 1982).

El hecho de que los hongos no predominen en el rumen se debe a su lento tiempo de generación en comparación con las bacterias, 6-9 vs. 0,5-3,5 h, y su paso a duodeno, aunque no ha sido estimado, también debe ser muy bajo (Varga y Kolver, 1997). En dietas forrajeras pueden representar el 8% de la masa microbiana (Orpin, 1981), pero su número se reduce en dietas ricas en concentrado o en forrajes de alta calidad con tiempos de retención más cortos. Tienen actividad celulasa y hemicelulasa pero no pueden degradar la pectina y el ácido poligalacturónico (Fonty y Joblin, 1991). No hay evidencia de que degraden la lignina, pero sus rizoides la pueden penetrar y facilitar la degradación de la pared celular (Van Soest, 1982).

#### **2.4. Interrelaciones entre los microorganismos**

Las poblaciones microbianas descritas anteriormente interactúan en el ecosistema ruminal para maximizar la eficiencia de fermentación del alimento (Van Soest, 1982). Desde el punto de vista de la nutrición microbiana, pueden establecerse dos grupos de microorganismos: los que fermentan los alimentos y los que fermentan los productos de fermentación producidos por los primeros. Esta segunda población tiene una función básica eliminando los productos finales de la fermentación del primer grupo y proporcionándoles factores esenciales para su crecimiento. Es por eso que en cultivos puros se descubren muchos productos finales que no se detectan en cultivos mixtos de microorganismos ruminales. Un ejemplo de estas relaciones son los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada (AGVR), que son producidos por las especies amilolíticas y son esenciales para las celulolíticas para la síntesis de aminoácidos o para la producción de ácidos grasos de cadena larga.

#### **2.5. Efecto de la dieta sobre las poblaciones microbianas**

La dieta es el factor más determinante sobre el tipo y las proporciones de poblaciones microbianas, por lo que determina el perfil de fermentación ruminal (Yokohama y Johnson, 1988). Las diferencias son máximas entre dietas forrajeras y dietas ricas en concentrado. Las dietas forrajeras favorecen el establecimiento de una flora fibrolítica, donde predominan bacterias del género *Butyrivibrio* spp. Mientras que en dietas concentradas con bajos niveles de fibra, la concentración bacteriana es mayor, con poblaciones amilolíticas donde predominan bacterias del tipo selenomonas, peptostreptococci y lactobacilli (McAllister y col., 1993). Estas dietas suelen tener altas velocidades de digestión y de producción de ácidos, por lo que el medio se acidifica y se reducen las poblaciones celulolíticas y metanogénicas que son más sensibles al pH ácido (Van Soest, 1982).

Ante un cambio de dieta, la población tiene que adaptarse hacia un nuevo equilibrio. El mayor riesgo se produce al introducir grandes cantidades de concentrado en animales que reciben una dieta forrajera, por su efecto sobre las bacterias que producen y utilizan lactato. En un primer momento, por efecto de un descenso en el pH, desaparecen las bacterias utilizadoras de lactato y las amilolíticas son sustituidas por otras bacterias productoras de lactato, llevando a un descenso de pH más grave, y una acidosis láctica. Pero al adaptarse, las poblaciones formadoras de lactato y las



utilizadoras se equilibran y prácticamente no se detecta ácido láctico en el contenido ruminal (Dehority y Orpin, 1988).

### **3. Desarrollo ruminal**

La capacidad fermentadora del rumen, que hemos mencionado en el apartado de ecosistema ruminal, no está presente en el rumiante recién nacido. Al nacer, el rumen no es un órgano funcional y el sistema digestivo y metabólico del rumiante no se diferencia de cualquier otro mamífero recién nacido.

El desarrollo ruminal se puede dividir en tres fases: fase de lactante o no rumiante (0-3 semanas); fase de transición (3-8 semanas), donde pasará de alimentarse a base de leche a alimentarse de productos vegetales; y fase de rumiante (a partir de las 8 semanas) donde ya se sustenta exclusivamente de alimentos vegetales (Wardrop, 1961). La duración de estas fases es aproximada y se puede manipular, como se verá posteriormente con el manejo de la alimentación.

#### **3.1. Fase de lactante o no rumiante**

En esta fase el animal obtiene toda su energía a través de la digestión de la leche por enzimas propias. El punto crítico de esta fase es el nacimiento, porque se pasa de la alimentación placentaria a la digestiva y gran parte del éxito de supervivencia durante los primeros días de vida, se deberá a la composición del calostro que aportará nutrientes, inmunidad pasiva y contribuirá al mantenimiento de la temperatura corporal (Ørskov y Ryle, 1998).

Aunque se comporte como el estómago de un monogástrico y los pre-estómagos sean muy rudimentarios, su patrón de contracción ya está establecido (Ørskov, 1992) y a las dos semanas de edad, los mecanismos nerviosos que estimulan la rumia ya son muy sensibles (Roy, 1980).

La leche se digiere en el abomaso, que es el compartimiento más desarrollado al nacimiento y el único glandular, donde se secretarán las enzimas (renina, pepsina) y el ácido clorhídrico necesarios para coagular y degradar la caseína; el suero lácteo pasará a duodeno con la lactosa disuelta, que será absorbida a nivel intestinal (Roy, 1980). El paso directo de la leche a abomaso se consigue a través de la gotera esofágica que es un pliegue muscular que se forma en los compartimentos pre-gástricos y al cerrarse formará un conducto que permitirá que el fluido ingerido pase directamente desde el cardias hasta el abomaso (Ørskov, 1992). El cierre de la gotera esofágica se

desencadena ante el estímulo de algunos componentes de la leche que tienen receptores específicos a nivel del tracto gastro-intestinal superior (Wester, 1930; Watson, 1944) y como reflejo condicionado ante la visión de la ubre o del sistema de lactancia artificial utilizado (cubo, tetina) durante el denominado comportamiento de “excitación juvenil” (Ørskov y col., 1970). El reflejo se va debilitando al reducirse el consumo de leche, pero mediante entrenamiento se podría mantener durante toda la vida, lo que podría tener interés para evitar la degradación de determinadas proteínas en el rumen.

Si el reflejo no es completo, entrará leche en el rumen inmaduro y su fermentación puede estimular el desarrollo epitelial de unas papilas más cortas y agrupadas (Tamate y col., 1962). Sin embargo, otros autores consideran que los AGV producidos no son suficientes para estimular el desarrollo papilar (Lane y col., 2000), o bien que la fermentación láctica es tan intensa que causa grandes descensos en el pH ruminal que destroza las papilas ruminales y selecciona unas poblaciones microbianas muy específicas (Ørskov, 1992).

### **3.2. Fase de transición**

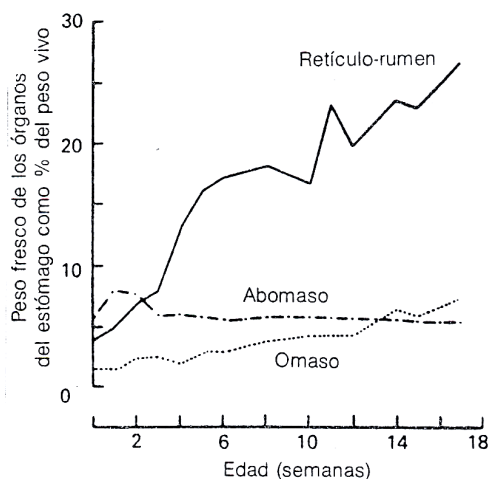
Esta fase es la más crítica porque el rumiante pasa de depender de las enzimas gástricas propias, a la simbiosis con los microorganismos ruminales, y el retículo-rumen debe pasar de ser un órgano no funcional, a ser una cámara de fermentación que aporte los productos de fermentación necesarios para el mantenimiento y crecimiento del animal.

Durante esta fase se producen una serie de cambios hacia el rumen maduro que le permitirán mantenerse a base de forraje y/o concentrado, como es aumentar de tamaño y adquirir las proporciones relativas adultas (desarrollo anatómico), establecer una población microbiana estable (desarrollo microbiológico) y una diferenciación papilar y metabólica para poder absorber y utilizar los productos de fermentación (Warner, 1991). Estos cambios se producirán paulatinamente al iniciarse el consumo de alimento sólido, y todos están interrelacionados entre sí para asegurar el éxito del destete, sin que se resienta el crecimiento ni la salud del animal (Klein y col., 1987).

#### **3.2.1. Desarrollo anatómico**

Al nacer el abomaso es la parte más desarrollada, representado el 50% del peso y tamaño del estómago (Lyford, 1988). Durante la fase de lactancia, las pautas de crecimiento de los distintos compartimentos son similares y al iniciarse el consumo de

alimento sólido comienza el rápido crecimiento del retículo-rumen. A las 8 semanas de edad, el rumen experimenta su máximo crecimiento, alcanzando proporciones próximas a las del adulto con respecto a los otros órganos digestivos y al peso corporal. Después la totalidad del estómago aumentará en capacidad y en peso, proporcionalmente al peso corporal. En el rumiante adulto el rumen llega a representar el 80% de la capacidad gástrica (Roy, 1980). El omaso y abomaso no sufren estos rápidos crecimientos, sino que crecen lentamente durante todo el desarrollo (Figura 4).



**Figura 4.** Crecimiento del estómago de los terneros desde el nacimiento hasta las 17 semanas de edad, alimentados con sustituto de leche y con acceso a forrajes (Lyford, 1988).

Al ir creciendo los compartimentos gástricos irán adquiriendo las posiciones adultas dentro de la cavidad abdominal, y los otros órganos abdominales se redistribuirán para dar cabida al rápido desarrollo del rumen que llegará a ocupar la totalidad del lado izquierdo de la cavidad (Tamate y col., 1962).

### 3.2.2. Desarrollo microbiológico

El establecimiento de las poblaciones microbiológicas dependerá de su inoculación y de que éstas encuentren las condiciones ruminales adecuadas para su crecimiento, hasta conseguir una microflora estable y diversa. Estas condiciones se consiguen con el consumo de alimento sólido ya que la leche es muy fermentable y selecciona una población ruminal muy específica.

El contacto con otros animales parece ser la principal vía de inoculación, siendo ésta la única para los protozoos. Las bacterias pueden inocularse en el rumen mediante el alimento, el medio o incluso los lactobacilos se inoculan por reflujo de contenido lácteo del abomaso (Roy, 1980).

### **3.2.2.1. Inoculación y establecimiento de las bacterias**

Las bacterias están presentes en el rumen desde los primeros días de vida, antes de que se inicie el consumo de alimento sólido (Minato y col., 1992; Anderson y col., 1987b). Pero como observaron Bryant y col. (1958) y Bryant y Small (1960), las poblaciones predominantes a las 1-3 semanas de edad son diferentes que en los animales adultos; aproximadamente en la semana 6 ya son más parecidas y entre las semanas 9-17 las bacterias predominantes son las típicas de los animales adultos.

El primer día de vida colonizan el rumen bacterias aeróbicas o anaeróbicas facultativas como estreptococos, *Escherichia coli* y lactobacilos (Minato y col., 1992), que prácticamente no están presentes en el rumen desarrollado (William y Dinusson, 1972). Después se produce la colonización secuencial por grupos funcionales: las primeras son las amilolíticas, alcanzando un número constante a los 3 días de edad; después colonizan las bacterias incluidas dentro de los grupos reductoras de sulfato, utilizadoras de lactato (producido por las amilolíticas), fermentadoras de xilano y fermentadoras de pectina; las celulolíticas necesitan nutrientes producidos por los grupos bacterianos anteriores, por lo que colonizan el rumen a los 3-5 días de edad. En último lugar se produce la colonización de las metanogénicas que tienen una relación simbiótica con las bacterias celulolíticas y se establecerán después de éstas (Minato y col., 1992).

Aunque las bacterias están presentes desde el primer día de vida, con el consumo de alimento sólido proliferarán las poblaciones anaeróbicas estrictas y se potenciará la actividad fermentativa. Cuanto antes se inicie el consumo de alimento sólido, antes se desarrollará la población microbiana, conduciendo a una actividad metabólica más alta (Anderson y col., 1987a).

### **3.2.2.2. Inoculación y establecimiento de los protozoos ciliados**

Su establecimiento ruminal es más complicado que el bacteriano, ya que necesitan del contacto directo con un rumiante faunado y al ser muy sensibles al pH ácido, no se establecen en el rumen hasta que no se inicia el consumo de alimento sólido y la

fermentación bacteriana empieza a ser estable, aproximadamente a las 3-6 semanas de edad (Bryant y Small, 1960).

La colonización de los protozoos también es secuencial, los primeros son los del género *Entodinium*, seguidos de *Diplodinium* y en último lugar los de la subclase *Holotrica* (Minato y col., 1992).

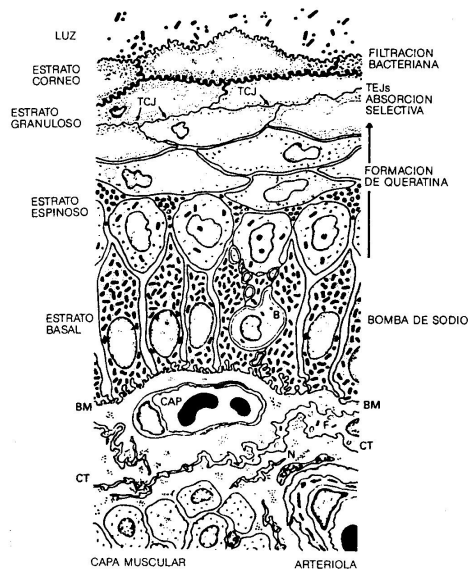
### **3.2.3. Diferenciación**

El desarrollo del tamaño y de las proporciones relativas de los compartimentos gástricos irá acompañado de una diferenciación de los tejidos, con un aumento de las capas musculares y de la mucosa interna donde se desarrollarán las papilas. También en el epitelio interno se producirán muchos cambios metabólicos encaminados a cambiar el sustrato de oxidación, de glucosa se pasará a los productos de fermentación microbiana, como el butirato y se desarrollará la capacidad de cetogénesis (Baldwin y Jesse, 1992).

#### **3.2.3.1. Epitelial**

El epitelio de los pre-estómagos (rumen, retículo y omaso), es no glandular y en vías de queratinización y en el rumiante adulto está cubierto de grandes papilas, que amplían la superficie de absorción ya que su función es absorber y metabolizar AGV. El epitelio es muy complejo con distintas capas celulares que se van diferenciando y ascendiendo hacia la luz ruminal. Las células del estrato basal tienen gran capacidad metabólica con grandes vesículas, ribosomas, mitocondrias y las células superficiales están queratinizadas ofreciendo una buena protección frente a la abrasión (Figura 5).

Al nacimiento las papilas ruminales están bien desarrolladas, son de tamaño pequeño pero su número es muy elevado, posiblemente porque durante la vida fetal reciben la estimulación a través de los AGV de la sangre materna (Tamate y col., 1962). Durante la fase de lactante sufren una cierta regresión o un desarrollo anormal (ver apartado 3.1.) y no se desarrollarán totalmente hasta que no se inicie el consumo de alimento sólido, al igual que la capa muscular, cuya función es mezclar el contenido y movilizarlo a través de todo el tubo digestivo. Aunque durante la etapa de lactante el retículo-rumen haya aumentado de tamaño, sus paredes siguen siendo flácidas.



**Figura 5.** Diagrama de la sección transversa de la pared ruminal totalmente desarrollada (Lyford, 1988).

### 3.2.3.2. Absorción y metabolismo

El metabolismo ruminal, entendido como la captación de AGV, por transporte pasivo, y su conversión a cuerpos cetónicos está poco desarrollado en el nacimiento y durante la fase de lactante. Su desarrollo va ligado al desarrollo papilar, en parte porque aumentará la superficie interna de absorción, y en parte porque los estímulos que activan el desarrollo papilar, como el consumo de alimento sólido y los productos de fermentación, también activarán el desarrollo metabólico del estrato basal de la mucosa ruminal (Sutton y col., 1963).

Durante el desarrollo ruminal se producirán grandes cambios en los metabolitos disponibles para el mantenimiento y crecimiento del animal. En los pre-rumiantes la glucosa es la principal fuente de energía, pero al irse desarrollando la función ruminal va descendiendo la tolerancia a la glucosa, y aumenta la absorción y metabolismo de los AGV en el epitelio ruminal (Quigley y col., 1991; Lane y Jesse, 1997) que serán el principal aporte energético de los rumiantes adultos (Fahey y Berger, 1988). Al nacimiento las células del epitelio ruminal oxidan glucosa y butirato al mismo ritmo. En cambio, al destete, la velocidad de oxidación de glucosa desciende y el butirato se convierte en el principal substrato de oxidación aumentando en seis veces la producción de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHBA) (Baldwin y Jesse, 1992).

De los AGV absorbidos, el butirato será el que más se metabolice a nivel de epitelio ruminal, formando cuerpos cetónicos, mayoritariamente BHBA, y en menor medida acetoacetona y acetona. El acetato se metabolizará a cuerpos cetónicos en pequeña proporción, y la mayor parte pasará a circulación sistémica para ser oxidado, vía ciclo del ácido tricarbóxico, o utilizado como precursor de la liposíntesis. El propionato se metabolizará en pequeña proporción (2-5 %) a ácido láctico y mayoritariamente llegará a hígado a través de la circulación porta, para ser oxidado o utilizado como precursor de la gluconeogénesis (Brockman, 1993).

### **3.3. Fase de rumiante: consumo de alimento sólido**

Aunque el rumen tenga la capacidad innata de desarrollarse, es el consumo de alimento sólido el desencadenante del desarrollo ruminal en todos los aspectos comentados en los apartados anteriores, y será la cantidad de leche consumida durante la fase de lactancia la que estimulará o retrasará este desarrollo. Un consumo insuficiente de nutrientes a partir de la leche estimula el consumo de alimentos sólidos y el desarrollo de los pre-estómagos. Si los terneros tienen acceso a cantidades decrecientes de leche, aproximadamente a los 7 días de vida comenzarán a consumir alimentos sólidos (Roy, 1980).

#### **3.3.1. Sobre el desarrollo microbiológico**

Aunque las poblaciones microbianas estén presentes en el rumen desde los primeros días de vida (Anderson y col., 1987b; Minato y col., 1992), será la presencia de alimento fermentable lo que active la actividad microbiológica y pocos días consumiendo alimento sólido son suficientes para aumentar significativamente la capacidad fermentativa del rumen. Poe y col. (1971) observaron que corderos alimentados con un pienso de iniciación desde el nacimiento, a las 2 semanas de edad tenían la misma capacidad para degradar celulosa y almidón que corderos de 10 semanas de edad alimentados por el sistema tradicional, mientras que corderos alimentados a base de leche a las 2 semanas no tenían esa capacidad, pero tres días consumiendo alimento sólido eran suficientes para aumentar significativamente su capacidad fermentativa.

#### **3.3.2. Sobre el desarrollo muscular y papilar**

El consumo de alimento sólido produce dos tipos de estimulación, una física y una metabólica. La primera está producida por alimentos voluminosos como los forrajes, o material inerte introducido dentro del rumen (Tamate y col., 1962) que aumenta el volumen del retículo-rumen y su tono muscular. La segunda, está mediada por los productos de fermentación sobre la diferenciación epitelial.

Los alimentos muy fermentescibles, como los concentrados, producen gran cantidad de AGV que estimulan el desarrollo papilar, pero producen una menor estimulación táctil, lo que conlleva menos contracciones ruminales y un bajo desarrollo de la capa muscular. Al contrario, los alimentos forrajeros estimulan el desarrollo muscular, pero producen menos AGV para estimular el desarrollo epitelial (Warner y col., 1956; Sander y col., 1959; Roy, 1980; Ørskov, 1992; Nocek y col., 1984).

Al ver que el desarrollo papilar estaba estimulado por los productos de fermentación, muchos experimentos se llevaron a cabo para ver cuales AGV eran más estimulantes. El más eficaz en el desarrollo papilar parece ser el butirato, seguido por propionato y acetato (Sakata y col., 1980; y Warner, 1991). Los primeros estudios describieron la estimulación del butirato y propionato mediante un mecanismo directo, por un aumento del flujo sanguíneo en el epitelio ruminal durante su metabolismo (Sander y col., 1959). Sin embargo, esta estimulación del butirato y el propionato sobre la diferenciación epitelial, no se observó cuando se realizaron incubaciones *in vitro* con cultivos de tejido ruminal (Gálfi y col., 1981), incluso la adición de butirato disminuía los índices mitóticos. Esta contradicción entre los estudios *in vitro* e *in vivo* sugiere que la acción estimuladora del butirato y el propionato es indirecta, mediada a través de la insulina que *in vitro* estimula el índice mitótico y epitelial del rumen, e *in vivo* se secreta bajo el estímulo del butírico y del propiónico (Sakata y col., 1980; Baldwin y col., 2004).

En la estimulación indirecta sería más importante el propionato, ya que el butirato prácticamente no pasa a sangre y, a pesar de la contradicción con los estudios *in vitro* (Gálfi y col., 1981), no podemos descartar la estimulación local por el butirato, ya que prácticamente todo el butirato absorbido se metaboliza a nivel de la pared ruminal (Baldwin y col., 2004).

El efecto estimulador de los alimentos forrajeros sobre la musculatura y el volumen ruminal, y de los productos de fermentación sobre el desarrollo epitelial es reversible. La fermentación ruminal debe ser continua para que se mantenga la integridad de las papilas ruminales y si se vuelve a una dieta a base de leche, se



producirá una regresión papilar y del tejido muscular del retículo-rumen (Warner, 1991).

### 3.3.3. Sobre el desarrollo metabólico

La diferenciación papilar por efecto de los AGV tiene efectos directos sobre la diferenciación metabólica, aunque en el metabolismo es importante el control ontogénico de los genes que controlan la cetogénesis (Baldwin y col., 2004).

Un estudio de Bush (1988) evidenció que la cetogénesis estaba directamente relacionada con el desarrollo epitelial y con la presencia de AGV. El consumo de alimento sólido parecía ser el único estímulo necesario para el desarrollo epitelial y metabólico. Lane y Jesse (1997) observaron que aunque los AGV estimulan el desarrollo morfológico y metabólico, no son los únicos responsables y señalan que otros productos de la fermentación microbiana, como los AGVR o el amoniaco pueden ser necesarios para completar el desarrollo del epitelio ruminal. Lane y col. (2000) siguen postulando que el consumo de alimento sólido estimula la capacidad cetogénica, pero observan que en corderos alimentados únicamente a base de leche, donde la concentración de AGV no aumentó durante todo el experimento, con la edad aumentó la producción de  $\beta$ -hidroxibutirato, indicando que el consumo de alimento sólido no era necesario para activar la capacidad cetogénica del epitelio ruminal. Sin embargo, no se observaron otros cambios metabólicos, indicando que otras vías metabólicas sí se pueden estimular con el consumo de alimento sólido. En un tercer trabajo, Lane y col. (2002) ya son más contundentes y afirman que los AGV no estimulan la cetogénesis del rumen, sino que los genes que controlan esta ruta metabólica se expresan a una determinada edad, independientemente del consumo de alimento sólido. Es más, Quigley y col. (1991) observaron que la utilización de las cetonas por los órganos periféricos respondía a un control ontogénico, independiente del consumo de alimento seco y de la producción de AGV a nivel ruminal.

No se puede negar la evidencia de todos estos experimentos, ni del cambio que ha habido en la concepción del desarrollo metabólico. Por una parte, los AGV estimulan el desarrollo papilar y metabólico (Bush, 1988; Lane y Jesse, 1997) y por otra, las enzimas que controlan la cetogénesis se expresan conforme a un control ontogénico (Lane y col., 2002), por lo que ambos mecanismos no tienen porque ser mutuamente excluyentes.

En resumen, mediante la alimentación podemos manipular el desarrollo ruminal y consecuentemente, adelantar o retrasar el destete. Se sabe, que los alimentos forrajeros aumentan el volumen, el tono de la capa muscular y mantienen la integridad papilar, y que los alimentos altamente fermentescibles, que producen gran cantidad de AGV, estimulan la diferenciación y maduración epitelial. En las terneras de carne blanca nos puede interesar retrasar el desarrollo ruminal y que los animales se alimenten durante todo su vida a base de leche que será eficientemente digerida en abomaso e intestino delgado (Ørskov, 1992). En cambio, en los sistemas de producción intensiva nos puede interesar adelantar la edad al destete, para reducir la mano de obra, los costes de alimentación y la incidencia de enfermedades (Coverdale y col., 2004). Lo anterior es posible iniciando a los animales al consumo de alimento sólido desde muy temprana edad (Anderson y col., 1987a; Klein y col., 1987), con una dieta que sea muy aceptada y promueva el consumo en el animal. Al estar las poblaciones microbianas presentes desde los primeros días de vida, el alimento sólido podrá ser fermentado y los productos de fermentación formados van a contribuir al desarrollo ruminal, sin olvidar las limitaciones ontogénicas de las enzimas que controlan el metabolismo de las cetonas a nivel de epitelio ruminal (Lane y col., 2002) y periférico (Quigley y col., 1991).

En conclusión, para que el destete tenga éxito y no se resienta el crecimiento, el ternero tiene que consumir la suficiente cantidad de comida y haber adquirido el suficiente grado de desarrollo para poder sobrevivir exclusivamente de los productos de la fermentación ruminal (Klein y col., 1987) y por eso son de vital importancia las características de las dietas de iniciación que tienen que promover el consumo de alimento sólido y al mismo tiempo un adecuado desarrollo ruminal.

### **3.4. Dietas de iniciación**

Para promover un buen desarrollo ruminal y poder adelantar la edad al destete, sin que se retrase el crecimiento o empeore la conformación, los animales deben consumir una dieta altamente fermentescible desde muy temprana edad. Esta dieta debe incluir la adecuada cantidad de fibra para asegurar un correcto desarrollo muscular y la integridad papilar sin que cause problemas gastro-intestinales o sistémicos en el animal en crecimiento o posteriormente en el animal adulto. Para esto, es necesario controlar la composición y la presentación de estas dietas de iniciación.

En los años 50 se recomendaban dietas de iniciación compuestas sólo de ingredientes concentrados (Bartley, 1973), ya que son los productos de fermentación los

que estimulan el desarrollo epitelial, pero un exceso de estimulación puede provocar papilas anormales y exceso de queratinización que dificulte la absorción de AGV (Warner, 1991; Nocek y col., 1984)

Aunque el forraje no estimule tanto el desarrollo papilar (Nocek y col., 1980), la fibra es necesaria porque promueve el desarrollo muscular del rumen, la rumia y salivación, y mantiene la integridad epitelial eliminando las células muertas y las partículas que se acumulan en la superficie epitelial, facilitando la absorción (Nocek y col., 1984). Sin embargo, el nivel de fibra de las dietas de iniciación no está claro (Klein y col., 1987). Algunos estudios han encontrado que la fibra aumenta el consumo de las dietas de iniciación y otros que lo disminuyen, posiblemente por diferencias en la forma de presentación de la fibra y en el tamaño de partícula de la misma, que puede causar grandes variaciones en el consumo (Coverdale y col., 2004).

Hodgson (1979a,b) recomendó dar los forrajes peletizados, ya que eran mejor aceptados y no provocaban descensos de ingestión en el destete, que si lo provocaban los forrajes groseros, si los animales no habían sido previamente acostumbrados. Bartley (1973) observó que el consumo era mayor al administrar las dietas de iniciación mediante un pellet de forraje y concentrado, que si se administraban por separado. Murdock y Wallenius (1980) mantuvieron el pellet con forraje y concentrado como la presentación más adecuada, y probaron diferentes fuentes de fibra no efectiva, resaltando la cascarilla de algodón que estimulaba el consumo y el crecimiento, aunque también aumentaba la incidencia de diarreas.

Otro punto importante es el tamaño de partícula de la fibra incluida. Coverdale y col. (2004) observaron que puede ser suficiente incluir un forraje no muy grosero de un tamaño de partícula de 8-19 mm, para mantener buena salud ruminal y sin que repercuta negativamente sobre el crecimiento, resultando en ingestiones más altas y mejores eficiencias.

### **3.5. Dietas concentradas**

En dietas altamente fermentescibles hay riesgo de sufrir paraqueratosis, que puede definirse como una queratinización incompleta, como resultado de una proliferación y migración hacia el exterior de las células del extracto basal, posiblemente provocado por una proliferación excesiva y anormal del epitelio ruminal por exceso de estimulación (Sakata y col., 1980). Este engrosamiento de las capas celulares reduce la capacidad de absorción que se compensará mediante ramificación papilar. La

paraqueratosis se caracteriza por la ramificación papilar y por la acumulación de pelos, mientras que el color y la longitud de las papilas no está tan directamente relacionado (Roy, 1980).

La paraqueratosis se ve favorecida por tres factores que se dan en dietas concentradas,

- a. Altas concentraciones de AGV, con disminución de la relación acetato:propionato, lo que provocará una gran estimulación de la proliferación epitelial.
- b. pH bajo, el aumento en la concentración de  $H^+$  puede desnaturalizar las proteínas de las capas epiteliales más superficiales o activar las enzimas proteolíticas bacterianas que atacaran las proteínas de las membranas de las células epiteliales (Haskins y col., 1969).
- c. Bajo tono muscular, pocas contracciones, con lo que se acumulan pelos y comida sobre la superficie epitelial.

Cuando los rumiantes pasan de una dieta forrajera a una concentrada, pueden tener problemas para adaptarse a esta dieta mucho más fermentativa, y pueden sufrir ruminitis y/o paraqueratosis, pero tanto la microflora como el epitelio ruminal tienen el potencial para adaptarse morfológica y funcionalmente a estas dietas (Sakata y col., 1980).

### **3.6. Capacidad fermentativa del rumen en desarrollo**

Aunque algunos trabajos consideran que la función ruminal se desarrolla rápidamente después del destete precoz (Quigley y col., 1985; Anderson y col., 1987a,b; Lallès y Poncet, 1990), se suele observar un descenso en el crecimiento después del destete. Posiblemente porque los terneros no son capaces de ingerir la cantidad necesaria para alcanzar su máximo potencial de crecimiento (Roy, 1980; Funaba y col., 1994).

Devant y col. (2000) estudiaron el desarrollo ruminal en terneros de los 100 a los 230 kg, y observaron que el desarrollo continuaba después del destete, entendido este desarrollo como cambios en el perfil de fermentación y en la eficiencia de síntesis microbiana. Por lo que no se puede afirmar que unas semanas de consumo de alimento sólido sean suficientes para alcanzar una fermentación equivalente al animal adulto.

#### 4. Función ruminal en el rumen desarrollado

Los carbohidratos y la proteína son los principales sustratos fermentables para la población microbiana. De estos nutrientes obtendrán básicamente la energía y los compuestos nitrogenados para su crecimiento.

##### 4.1. Degradación de carbohidratos

Los carbohidratos son la principal fuente de energía para los microorganismos ruminales (Hungate, 1966) y el componente cuantitativamente más importante de la dieta de los rumiantes. Además de aportar energía a los microorganismos y al rumiante, se encargan de mantener el óptimo funcionamiento del rumen.

Desde el punto de vista estructural, por su biosíntesis los carbohidratos se dividen en estructurales (constituyentes de la pared celular, e incluyen celulosa, hemicelulosa y pectina) y no estructurales (no forman parte de la estructura vegetal, y se componen de azúcares simples, hidratos de carbono de reserva y ácidos orgánicos). Desde el punto de vista nutricional, más enfocado hacia la biodegradación, se pueden clasificar en fibrosos (corresponden a la fibra neutro detergente (FND) de Van Soest, (1982)) y no fibrosos (Tabla 3). Las únicas diferencias entre las dos clasificaciones son la pectina, que siendo un carbohidrato estructural no se incluye dentro de la FND del análisis de Van Soest (1982) y la lignina, que sin ser un carbohidrato, se encuentra íntimamente ligado a la pared celular y se incluye dentro de la fracción de FND.

**Tabla 3.** Clasificación de los carbohidratos (adaptado de Van Soest, 1982).

Carbohidratos	Composición
<b>No fibrosos</b>	
Azúcares solubles	Mono y di-sacáridos
Carbohidratos de reserva	
Almidón	Polímero de glucosa unidas por enlaces $\alpha$ 1-4, $\alpha$ 1-6
Fructosanos	Polímero de fructosa
Levanos	Enlaces $\beta$ 2-6 (forrajes verdes y granos de cereal)
Inulinas	Enlaces $\beta$ 2-1 (tubérculos)
Pectinas	Ácido galacturónico, arabinosa, galactosa
Ácidos orgánicos	Productos de fermentación de otros carbohidratos (ensilados)
<b>Fibrosos</b>	
Celulosa	Polímero de glucosa unidas por enlaces $\beta$ 1-4
Hemicelulosa	Xilanos, glucosa, arabinosa, manosa, galactosa, ácido galacturónico
Lignina	Polímero fenólico unidos por enlaces cruzados muy complejos

Los carbohidratos no fibrosos fermentan rápidamente, aportando energía para los microorganismos y para el animal, pero aumentan el riesgo de acidosis ruminal. En cambio, los fibrosos son más resistentes a la degradación, estimulan más la rumia y aumenta la producción de saliva que actúa como tampón ruminal. Los carbohidratos fibrosos tienen inferior concentración energética y puede limitar la ingestión, pero la capacidad microbiana para degradarlos es lo que hace especialmente beneficiosa la simbiosis con los microorganismos ruminales, ya que las enzimas propias de los rumiantes no los pueden digerir (Chesson y Forsberg, 1988; Ørskov y Ryle, 1998).

#### **4.1.1. Carbohidratos no fibrosos**

Son aquellos que desde el punto de vista del análisis químico no forman parte de la FND, y este grupo se compone de los carbohidratos de reserva de las plantas, azúcares solubles, pectinas y ácidos orgánicos (Tabla 3). Como se ha mencionado anteriormente, las pectinas forman parte de la pared celular, pero no se incluyen dentro de la FND de Van Soest (1982) y al tener un perfil de fermentación parecido a los almidones, con una degradabilidad ruminal cercana al 100% (Nocek y Tamminga, 1991), se incluyen dentro de esta categoría.

Los azúcares solubles, solamente son abundantes por periodos cortos de tiempo después de la ingestión de alimento y posteriormente actúan como metabolitos intermedios en la degradación de carbohidratos más complejos (Hungate, 1966). Su degradación es inmediata por una gran variedad de poblaciones bacterianas que digieren carbohidratos más complejos.

El almidón y los fructosanos son degradados eficientemente por las bacterias amilolíticas, siendo el propionato el principal producto de fermentación (Figura 6). Hay gran número de especies bacterianas que poseen actividad amilolítica, y su degradación comenzará por la adhesión del microorganismo al sustrato. Después intervienen diversos tipos de enzimas que actúan sinérgicamente degradando toda su estructura. Determinadas especies bacterianas pueden tener actividad sólo por una parte de la degradación, por lo que son frecuentes las asociaciones bacterianas entre especies amilolíticas e incluso con especies no amilolíticas (Hungate, 1966). Unas especies inician la degradación del almidón, pero no pueden degradar los productos solubles formados, que serán degradados por otras especies (Ørskov y Ryle, 1998).

Los protozoos también tienen una función importante en la degradación del almidón, engullen los gránulos, los fermentan intracelularmente y almacenan el exceso

de energía como amilopectina, evitando así su rápida degradación por parte de las bacterias y un descenso pronunciado del pH ruminal (Mackie y col., 1978).

La acidificación del pH es el gran riesgo de los alimentos concentrados. Por una parte los concentrados, ricos en almidón, estimulan menos la masticación, por lo que la producción de saliva será menor y el líquido ruminal estará menos tamponado. Por otra, son muy fermentescibles y producen gran cantidad de AGV (Ørskov, 1992). Las bacterias amilolíticas son resistentes al pH ácido, pero pueden desestabilizar el resto de la fermentación ruminal, inhibiendo la actividad de las celulolíticas.

Aunque los almidones se degradan en gran proporción en el rumen, en función del tipo y el grado de procesamiento, podrán escapar parcialmente de la degradación ruminal, para ser digeridos a nivel intestinal por la acción de la amilasa pancreática. La extensión y la velocidad de fermentación del almidón varían entre especies vegetales (Tabla 4), por un efecto de la estructura en que se encuentra el almidón en el endospermo, que facilite o no el ataque microbiano (Cheng y col., 1991; McAllister y col., 1993). Las propiedades del almidón en sí (proporción de amilosa y amilopectina) no son tan importantes, ya que la degradación de almidón purificado de distintos cereales es muy similar (McAllister y col., 1993). En los cereales más resistentes, como el maíz o el sorgo, los gránulos de almidón están protegidos por una estructura proteica que dificulta la adhesión de las bacterias amilolíticas, lo que reducirá su degradación. Por otra parte, mediante determinados tratamientos podemos manipular la degradación ruminal del almidón, en la medida en que las estructuras responsables de la resistencia a la acción enzimática, puedan ser alteradas. El tratamiento con formaldehído o amoníaco reduce la adhesión bacteriana, y por tanto, la velocidad de degradación (Cheng y col., 1991).

**Tabla 4.** Degradabilidad del almidón de varios cereales determinada mediante técnicas *in vitro* e *in situ* o *in vivo* (adaptado de Nocek y Tamminga, 1991).

Cereal	<i>In situ e in vitro</i>				<i>in vivo</i>			
	n	media	DS <sup>a</sup>	Rango	n	media	DS <sup>a</sup>	rango
Avena	2	94,3	6,6	89,6-99,0	2	84	11,1	76,1-91,8
Cebada, molida	3	89,9	6,2	83,2-97,0	4	87,9	4,6	82,4-93,0
Maíz, molido	5	58,4	5,1	53,1-67,0	11	76,4	12,1	51,4-93,0
Sorgo, molido	2	54,2	4,4	51,0-57,3	9	67,3	17,5	42,0-91,0
Trigo, molido	3	90,5	7,3	96,1-99,0	5	89,3	2,1	85,6-91,7

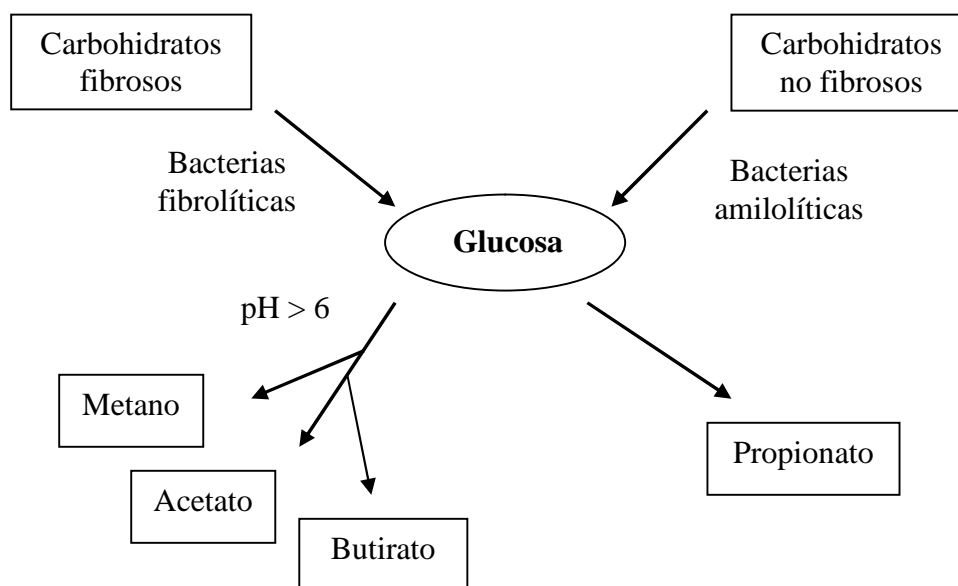
<sup>a</sup>DS = desviación estándar

Las pectinas tienen un elevado contenido energético y son fermentadas rápidamente, pero a diferencia de los almidones, el acetato es el principal producto de su fermentación, lo que reduce el riesgo de acidosis (Van Soest, 1982). La actividad pectinolítica, se ha demostrado en bacterias y protozoos, pero es muy baja en los hongos anaeróbicos. Los microorganismos que degradan la pectina son especialmente sensibles a descensos en el pH ruminal (Strobel y Russell, 1986).

Los ácidos orgánicos, son productos de fermentación de los hidratos de carbono, y sólo son cuantitativamente importantes en los ensilados, aportando muy poca energía a los microorganismos ruminales.

#### 4.1.2. Carbohidratos fibrosos

La fibra vegetal está constituida por los carbohidratos estructurales de las plantas y es un agregado de componentes que no constituyen una entidad propia, pero que se entrelazan formando una misma macromolécula (Chesson y Forsberg, 1988). Las microfibrillas de celulosa, que es el componente mayoritario de la pared, forman un entramado tridimensional, sobre una masa amorfa compuesta por hemicelulosa, pectina y lignina, y a la que frecuentemente se le asocian minerales y otros componentes. La lignina no es un carbohidrato, es un polímero fenólico localizado en la pared celular secundaria (Cheng y col., 1991), pero se engloba dentro de este concepto por su estrecha relación con los carbohidratos estructurales.



**Figura 6.** Vías metabólicas de la degradación de carbohidratos fibrosos y no fibrosos.



La fibra se considera que agrupa los componentes de la pared celular, pero según el método de extracción utilizado agrupará distintos componentes, surgiendo las siguientes definiciones (Van Soest, 1982):

- Fibra neutro detergente: material insoluble en solución detergente neutra. Se compone de celulosa, hemicelulosa, lignina y puede contener residuos de almidón, cenizas y nitrógeno. Es la definición más utilizada.
- Fibra ácido detergente: material insoluble en solución detergente ácida. Está constituida por celulosa y lignina, aunque puede contener residuos de nitrógeno y minerales.
- Fibra bruta: material insoluble en solución ácida, seguida por una alcalina, y está constituido por celulosa, aunque puede contener residuos de hemicelulosa, lignina y compuestos nitrogenados.

#### 4.1.2.1. Proceso de degradación

La fibra se degrada lentamente, por lo que la adhesión de los microorganismos a la pared celular es el primer paso para iniciar su degradación, y para asegurar que los microorganismos permanecerán en el rumen el máximo tiempo, al asociarse a la parte más indigestible de la estructura vegetal. Esta adhesión puede ser vía uniones específicas con adhesinas (moléculas de la superficie microbiana que se une a receptores del material vegetal), o uniones inespecíficas con enlaces iónicos (Chesson y Forsberg, 1988). Los primeros puntos de unión se localizan en los bordes de las partículas, en lesiones superficiales o en los estomas. Debido a que la superficie externa de las estructuras vegetales suele estar recubierta por lignina, taninos, cutina y sílice que dificultan el ataque microbiano (Hoover, 1986), el proceso de degradación va de dentro hacia fuera. Los hongos son los únicos capaces de penetrar la cutina y la lignina, proporcionando nuevos sitios para la adhesión bacteriana, por lo que tienen una función importante en la degradación de la fibra (Ho y col., 1988).

Las bacterias son las primeras en colonizar la estructura vegetal, siendo *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* las principales bacterias celulolíticas (Hungate, 1966). Después de las bacterias se producirá la colonización por protozoos y hongos. Los zoosporos fúngicos detectan los azúcares solubles que difunden de las partes lesionadas de las estructuras vegetales, van hasta esta zona, se enquistan e invaden el tejido con sus rizoides (Orpin y Bountiff, 1978). Un mecanismo similar de quimiostasis también se ha descrito en los protozoos

(Orpin, 1979). Los protozoos tienen gran actividad celulolítica y en determinadas condiciones, pueden representar más de la mitad de la actividad celulolítica del rumen (Ørskov y Ryle, 1998).

Una vez adheridos, se produce la degradación enzimática que consta de dos etapas. En la primera etapa, los polisacáridos complejos son hidrolizados hasta oligosacáridos de cadena corta (celobiosa, maltosa, xilobiosa) y azúcares sencillos mediante las celulasas y hemicelulasas. En una segunda etapa, los monosacáridos son metabolizados hasta piruvato y finalmente hasta AGV, siendo el acetato el principal producto final de degradación de los carbohidratos fibrosos (Figura 6). La actividad celulosa se realiza a través de un complejo enzimático que consta de tres enzimas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa) que trabajan sinérgicamente. Para degradar la hemicelulosa, también intervienen sinérgicamente más de una xilanasas.

Además del sinergismo a nivel enzimático, también son muy importantes los sinergismos entre grupos bacterianos, incluso con bacterias no fibrolíticas abundantes en dietas forrajeras (*Selenomonas ruminantium*, *Prevotella ruminicola*, *Streptococcus bovis*, *Treponema* o *Butyrivibrio*). Estas bacterias no celulolíticas degradan los productos de fermentación de la celulosa, como la celobiosa y celodextrina, y aceleran el proceso digestivo de la celulosa, evitando la inhibición por producto final (Russell, 1985; Cheng y col., 1991). Este sinergismo también está presente en la degradación de la hemicelulosa que es primero solubilizada por microorganismos no utilizadores de hemicelulosa (*Fibrobacter succinogenes* y *Ruminococcus flavefaciens*) para después los polisacáridos solubles ser fermentados por bacterias que los pueden utilizar pero no degradar, como *Prevotella ruminicola* (Fondevila y Dehority, 1994).

Al ser la fibra una mezcla tan heterogénea, sus componentes serán degradados en distinta intensidad por los microorganismos ruminales. Algunos componentes de la pared celular se degradarán rápidamente, mientras que otros prácticamente no se degradarán en el rumen y su degradación podrá continuar en el tracto gastro-intestinal posterior antes de ser excretados en heces.

El grado de degradación de la fibra en el rumen no solamente dependerá de la proporción de los componentes que la forman, sino que es más complejo y se verá afectado por una serie de factores como:

- a) Accesibilidad de los microorganismos al substrato.
- b) Densidad y actividad de las poblaciones fibrolíticas presentes en el rumen.

- c) Factores microbianos que controlan la adhesión e hidrólisis mediante complejos enzimáticos de las poblaciones microbianas adherentes.
- d) Factores relacionados con el animal (masticación, salivación y cinética ruminal) que determinarían la accesibilidad del sustrato a las bacterias (Varga y Kolver, 1997).

#### **4.1.2.2. Fibra efectiva (FND-e)**

La fibra, a parte de proporcionar energía para las poblaciones microbianas, tiene la función de asegurar unas buenas condiciones ruminales. Al ser un alimento voluminoso estimula las contracciones ruminales, y mantiene el pH ruminal a través del estímulo de la secreción salivar dependiente de la masticación y la rumia. El pH es el resultado de un equilibrio entre la producción de ácido, su absorción y la capacidad tampón del medio ruminal.

A partir de estas características de la fibra, surge el concepto de fibra efectiva (FND-e), como índice de valoración de la capacidad de la fibra como estimulante de la masticación, salivación y motilidad ruminal. La efectividad dependerá del tipo, forma y tamaño de la fibra que contenga, así como del grado de lignificación, hidratación y volumen (Varga y Kolver, 1997).

En un primer momento la FND-e se definió como el porcentaje de la FND que quedaba retenida en una criba de 1,18 mm (Smith y Waldo, 1969; Mertens, 1985). El tamaño de partícula parecía ser un elemento crítico en la efectividad de un forraje, y se relacionó con el orificio retículo-omasal (Poppi y col., 1980). Partículas insolubles menores de 4 mm en vacas y 2 mm en ovejas pueden abandonar el rumen sin necesidad de ser rumiadas (Van Soest, 1982). Ahora bien, tamaños de partícula superiores a este tamaño crítico parecen tener la misma efectividad que los forrajes groseros (Bourquin y col., 1994a,b), siempre y cuando el nivel de ingestión y el ritmo de paso no se vean afectados. Este primer acercamiento al concepto de FND-e estaba bien dirigido y se ajustó posteriormente por densidad, hidratación y grado de lignificación de la FND dentro de cada categoría de alimentos (NRC, 1996).

Al ser la efectividad de la fibra un parámetro de valoración indirecta, han surgido diferentes criterios para estimarlo, intentando integrar todos los factores que afectan a su efectividad, como el tiempo dedicado a masticar por unidad de MS ingerida (Balch, 1971), la velocidad de masticación, el tamaño de partícula o la grasa en leche (Varga y Kolver, 1997). En el ganado lechero, el concepto de fibra efectiva es mucho más

importante que en el vacuno de carne, porque para maximizar la producción de leche corregida al 4% de grasa y evitar problemas ruminales, se debe mantener un óptimo equilibrio entre los carbohidratos fibrosos y no fibrosos de la dieta. Sin embargo, la grasa en leche no es un buen indicador de la efectividad de la fibra, especialmente al inicio de la lactación, donde cambios en el porcentaje de grasa no siempre reflejan cambios en la efectividad de la fibra de la dieta (Varga y col., 1998). Además, el nivel de fibra necesario para mantener la grasa en leche es más alto que para mantener una correcta función ruminal (Soita y col., 2000).

En cambio en vacuno de carne producido intensivamente, al maximizar la ingestión de carbohidratos no fibrosos, los carbohidratos fibrosos tienen la única función de mantener un buen ambiente ruminal. Por eso, las recomendaciones del NRC para fibra efectiva son más estrictas para vacuno de leche que de carne. El NRC de 1989 para vacuno de leche recomienda entre un 19-21 % de FAD y un 25-28 % de FND en la ración, y un 75% de esta FND tiene que ser forrajera. Posteriormente en el NRC de 2001, las recomendaciones disminuyeron considerablemente. En el NRC de 1996, para vacuno de carne, los niveles de FND-e recomendados están orientados a mantener un determinado pH, ya que la FND-e resultó ser un preciso indicador del pH ruminal (Pitt y col., 1996) y se incorporó en las ecuaciones de predicción del pH. También se incluyó en las ecuaciones de predicción de la síntesis de proteína microbiana y de degradación de la fibra, porque observaron que estas dos variables estaban negativamente correlacionadas con el pH ruminal. Cuando el pH es inferior a 6,2, disminuye linealmente la síntesis de proteína microbiana y la degradación de la fibra (Russell y col., 1992; Pitt y col., 1996). Las recomendaciones del NRC (1996) son de un 5-8 % de FND-e sobre el total de MS de la dieta para maximizar el crecimiento de los terneros, prediciendo que el pH ruminal será superior a 5,6-5,7, lo que evitará fluctuaciones importantes en la ingestión. En cambio, si lo que se pretende es maximizar la degradación de la pared celular y la síntesis de proteína microbiana, el pH debe ser superior a 6,2, por lo que se recomienda dar un mínimo de 20% de FND-e sobre el total de la dieta (Pitt y col., 1996). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las necesidades en fibra efectiva dependerán del estado fisiológico del animal y de las características de la dieta (Allen, 1997).

La rumia está muy correlacionada con la ingestión de forraje. El tiempo destinado a rumiar por unidad de fibra es relativamente constante cuando la dieta tiene un máximo de 50-70 % de concentrado, pero aumenta al aumentar la proporción de grano. Los

animales alimentados con dietas altas en concentrado, rumian más por unidad de fibra forrajera consumida, que en dietas medias o bajas en concentrado, especialmente si los concentrados son rápidamente fermentescibles. Esto se puede explicar como un mecanismo de compensación para evitar descensos en el pH ruminal y en la celulolisis (Soita y col., 2000), masticando el forraje durante más tiempo cuando su nivel es bajo en la dieta (Grant, 1997) y manteniendo las condiciones ruminales favorables.

#### **4.1.2.2.1. Fibra no forrajera**

La fibra no forrajera o fibra proveniente de alimentos no forrajeros, no tiene la misma capacidad de estimular la rumia y la salivación que los forrajes. Algunos trabajos atribuyen el mismo valor de efectividad a todos los alimentos no forrajeros, del 66% (Nocek y Russell, 1988; Slater y col., 2000), o del 50% de su contenido en FND (Swain y Armentano, 1994). Pero es un error atribuir el mismo valor a todos los alimentos, porque se subestima el valor de algunos como la semilla de algodón y se pueden sobreestimar el de muchos otros. También es una imprecisión no incluir el tamaño de partícula en la valoración de la efectividad de los forrajes.

El CNCPS (Sniffen y col., 1992) aporta valores estimados de la efectividad de la fibra de forrajes y de alimentos no forrajeros, en función del tipo de alimento, procesado y tamaño de partícula (Tabla 5). Partiendo de estos datos, el NRC (1996) ajusta los valores FND-e de cada alimento en función de otros factores que influyen en el pH ruminal, como la velocidad de degradación ruminal, para que las predicciones reflejen bien las condiciones de fermentación.

Con estas recomendaciones se pueden incluir alimentos no forrajeros a la ración, siempre que se mantenga el mínimo de fibra efectiva, lo que conllevará un aumento de la FND no forrajera de la ración (Firkins, 1997). Este hecho es de especial importancia en la formulación de dietas ricas en cereales, ya que aportan un porcentaje importante de la fibra de la dieta, y aunque tiene menor capacidad para estimular la rumia, tienen cierto valor de efectividad.

Un efecto negativo de estas fuentes no forrajeras es que al tener menor retención ruminal, pueden desplazar la degradación de la fibra al tracto gastro-intestinal inferior, sin que se vea afectada la degradación total de la FND de la ración pero sin poder aprovechar la proteína microbiana sintetizada a partir de esta energía (Firkins, 1997; Pereira y Armentano, 2000).

**Tabla 5.** Valores de fibra efectiva (porcentaje de FND-e sobre el total de FND del alimento), de concentrados y forrajes en función del tamaño de partícula, según las recomendaciones de CNCPS (Sniffen y col., 1992).

<b>Alimento</b>	<b>FND-e / FND</b>	<b>Alimento</b>	<b>FND-e / FND</b>
<b>Concentrados</b>		<b>Forrajes</b>	
Bagazo de cerveza	18	Leguminosas	
Segundillas de trigo	2	Largo	92
Pulpa de cítricos	33	20% > 2,54 cm	82
Pulpa de remolacha	33	0,635 cm	67
Semilla de algodón	100	Gramíneas	
Alfalfa deshidratada, pellets	6	Largo	98
Cebada, molida	34	20% > 2,54 cm	88
Trigo, molido	34	0,635 cm	73
Avena, molida	34	Ensilado de maíz, 30-50 % de grano	
Granos de destilería	4	Corte normal	81
Maíz, entero	100	Corte pequeño	71
Maíz, molido	48		
Maíz, troceado	60		
Harina de soja	23		
Harina de algodón	36		

Por otra parte, siempre hay que tener en cuenta que los valores de fibra efectiva de un alimento, forrajero o concentrado, pueden variar dependiendo de los otros ingredientes de la dieta y de la calidad del forraje que el alimento no forrajero substituya (Varga y col., 1998).

#### **4.1.3. Degradación de los carbohidratos fibrosos en dietas concentradas**

La dieta es el principal factor que determinará la cantidad y el tipo de microorganismos en el rumen y por tanto la velocidad y grado de degradación de los nutrientes dietarios. Estudios realizados en los años 40 y 50 vieron que la degradación de los carbohidratos fibrosos disminuía al añadir alimentos ricos en carbohidratos no estructurales tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* (Burroughs y col., 1949; Kane y col., 1959; Ørskov y Fraser, 1975; Vadiveloo y Holmes, 1979).

En dietas concentradas no es importante la pérdida de energía producida por esta reducción en la degradación de la fibra o la disminución de la proporción de acetato, ya que los forrajes son los ingredientes menos energéticos de la dieta y están incluidos en muy baja cantidad. Es mucho más importante su efecto sobre la degradación de la proteína, como se describe en el punto 4.2.3.3.

A continuación se describirán los principales factores y mecanismos que provocan esta disminución en la degradación de la fibra en dietas concentradas.

#### **4.1.3.1. pH ruminal**

El descenso del pH ruminal, frecuentemente observado en dietas concentradas, ha sido considerado el principal factor responsable de la disminución en la degradación de la fibra observada en estas dietas. Numerosos estudios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* han observado una disminución en la celulolisis cuando el pH desciende por debajo de 6, y se ha considerado el umbral crítico para la celulolisis (Mould y col., 1983a,b; Hoover, 1986; Shriver y col., 1986; Russell y Wilson, 1996).

Sin embargo, *in vivo* el pH ruminal no se mantiene constante durante todo el día, sino que fluctúa, especialmente si la dieta es altamente fermentescible o si no se da un correcto manejo de la alimentación. Para la celulolisis es más crítico la magnitud del descenso y el tiempo en que el pH está por debajo del óptimo, que el pH medio diario (Itsasse y col., 1986; De Veth y Kolver, 2001).

Las poblaciones celulolíticas pueden aguantar fluctuaciones moderadas en el pH con una leve disminución de su actividad, pero si la depresión es más severa, serán arrastradas fuera del rumen y la celulolisis se reducirá considerablemente (Hoover, 1986; Calsamiglia y col., 2002).

Diversos mecanismos explican estos efectos del pH sobre la degradación de la fibra.

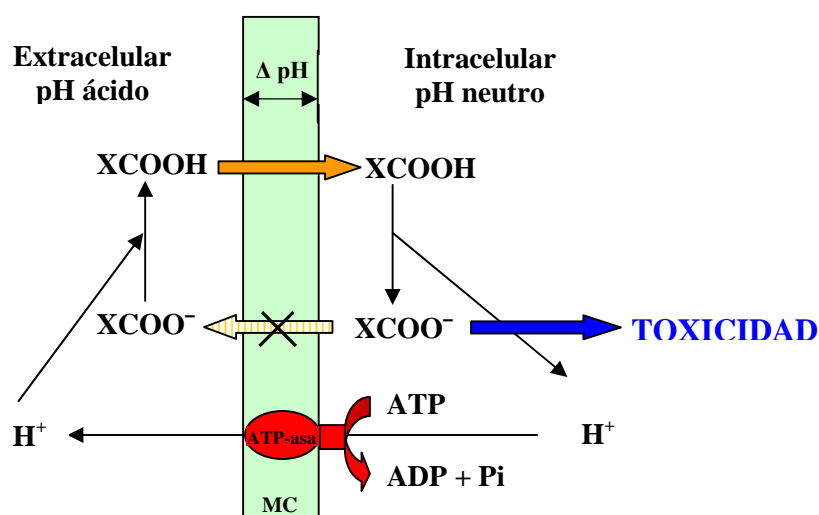
##### **4.1.3.1.1. Problemas de adhesión microbiana**

La adhesión de las bacterias al substrato es un punto crítico para la degradación de la fibra y para asegurar la permanencia de las especies celulolíticas en el rumen. Shriver y col. (1986) observaron que disminuciones moderadas del pH, debilitaban la adhesión de las bacterias celulolíticas a las estructuras vegetales, disminuyendo considerablemente la degradación y arrastrando las bacterias hacia el abomaso.

##### **4.1.3.1.2. Pérdida de potencial de membrana**

Russell y Dombrowski (1980) atribuyeron la baja tasa de replicación de las bacterias fibrolíticas en condiciones de pH desfavorables, a un aumento en los gastos de mantenimiento. Esta explicación se basa en la teoría quimiostática de Mitchell (1961). Las bacterias sensibles a pH ácido siempre mantienen la neutralidad del medio

intracelular. Cuando el pH ruminal es ácido, los AGV en la forma no disociada, entrarán al interior celular por un gradiente de pH y liberarán un protón en el medio intracelular. El anión, AGV en la forma disociada, saldrá en respuesta al gradiente eléctrico y volverá a reaccionar con un hidrógeno del medio extracelular, atravesando otra vez la membrana en la forma no disociada, los AGV actuarían como un desacoplador sintético transportando protones a través de la membrana bacteriana y el ciclo continuaría hasta que se perdiera el potencial de membrana (Figura 7). Para mantener el potencial de membrana las bacterias expulsan los protones hacia el exterior mediante una  $H^+$ -ATPasa. Este proceso requiere energía por lo que las bacterias destinarán energía a mantener el potencial de membrana, reduciendo la tasa de división y eventualmente resultando en una salida de estas poblaciones del rumen (Russell y Dombrowski, 1980).



**Figura 7.** Representación esquemática de un desacoplador (XCOOH) y su habilidad para translocar protones a través de la membrana celular bacteriana, y el efecto tóxico de los AGV ( $XCOO^-$ ) por acumulación, como respuesta a un gradiente de pH y por su incapacidad para atravesar la membrana celular (adaptado de Russell y Wilson, 1996).

#### 4.1.3.1.3. Efecto tóxico de los AGV

Sin embargo, esta teoría de la pérdida del potencial de membrana tiene varios errores. El primero, que la forma disociada de los AGV es hidrofílica, por lo que no puede atravesar libremente la membrana celular y se irá acumulando en el interior celular siguiendo la función logarítmica de Henderson-Hasselbalch, por lo que un



descenso de una unidad de pH en el medio extracelular aumentará diez veces la concentración del anión dentro de la célula, ejerciendo un efecto tóxico (Figura 7) (Russell y Wilson, 1996). El segundo, que los desacopladores sintéticos tienen la misma toxicidad para todas las bacterias, ya que desestabilizan el potencial de membrana (Russell, 1992). Sin embargo, no todas las bacterias tienen la misma sensibilidad al pH ácido. Las bacterias ácido resistentes (ej. *Streptococcus bovis* y *Prevotella ruminicola*) no mantienen la neutralidad en el medio intracelular, sino que disminuyen su pH intracelular como función del pH extracelular. Por ello el gradiente de pH a través de la membrana celular es más bajo y no se produce el flujo de AGV hacia el interior celular. Este mecanismo sólo es eficiente si las enzimas intracelulares no se inhiben con el pH bajo. Por ejemplo, *Ruminococcus albus*, adapta el pH intracelular al pH extracelular, pero sus enzimas se inhiben por efecto del pH ácido (Russell y Wilson, 1996).

El efecto del pH sobre la degradación de la fibra es innegable, con pequeñas variaciones dependiendo del tipo de forraje y concentrado administrado (Krajcarski-Hunt y col., 2001; Wales y col., 2004), pero no es el único factor responsable de la disminución en la degradación de la fibra que se observa en dietas concentradas. Estudios *in vitro* e *in vivo* con dietas concentradas donde el pH se ha mantenido constante, también han observado una disminución en la degradación de la fibra, no atribuible al pH. Por lo que hay otros factores implicados.

#### **4.1.3.2. Preferencia de los microorganismos ruminales por carbohidratos rápidamente degradables**

Mould y col. (1983a,b) sugirieron que el efecto del pH sobre la degradación de la fibra era bifásico, si el pH se reduce entre 6,7 y 6 hay una depresión moderada en la digestibilidad de la fibra y por debajo de 6 la depresión es más severa, por la pérdida de poblaciones celulolíticas. Esta primera depresión, no atribuible al pH, estaría causada por la preferencia de los microorganismos por los carbohidratos no estructurales y lo denominaron el 'efecto carbohidrato'.

Muchas bacterias celulolíticas (cepas de *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*) también son amilolíticas (Hungate, 1966) y en presencia de los dos substratos preferentemente degradarán el almidón y la maltosa antes que los carbohidratos estructurales (Mertens y Loften, 1980). En cambio las

bacterias del género *Ruminococcus*, que solamente puede degradar celulosa, no se verán afectadas por esta preferencia de sustrato.

Mertens y Loften (1980) observaron que al añadir almidón al medio de cultivo disminuía la degradación de la celulosa, por un aumento en el lag time de la degradación del forraje, es decir se tardaba más tiempo en iniciar la degradación de la fibra porque las bacterias degradaban preferentemente el almidón. Este efecto carbohidrato depende del tipo de forraje, posiblemente por diferencias en la morfología de la planta y el tipo de bacteria asociada.

Los protozoos que degradan los productos solubles de la celulolisis, también se verán afectados por este efecto carbohidrato. Éstos cubrirán sus necesidades preferentemente con los carbohidratos rápidamente fermentables, sin necesidad de asociarse con las bacterias celulolíticas, contribuyendo a la reducción de la degradación de la fibra (Ørskov y Ryle, 1998).

#### **4.1.3.3. Competencia por nutrientes esenciales**

Disminuciones en la actividad fibrolítica en dietas concentradas, no asociadas a pH ácido, también han sido atribuidas a competencia por nutrientes esenciales entre poblaciones microbianas. Esta competencia resultará en la proliferación de poblaciones amilolíticas que crecen más rápidamente y van a privar a las celulolíticas, que son más lentas, de determinados nutrientes.

La competencia se establece especialmente por el nitrógeno. Las bacterias amilolíticas, requieren péptidos y aminoácidos para su crecimiento, lo que puede limitar la disponibilidad de amoníaco y aminoácidos para las bacterias fibrolíticas (Russell y col., 1983). Es más, en condiciones de pH ácido, también se reduce la degradación proteica por la dificultad de las bacterias para adherirse al sustrato, por lo que también se reducirá la concentración de amoníaco y de AGVR, esenciales para las poblaciones celulolíticas (Shriver y col., 1986). En estos casos, la celulolisis podría recuperarse parcialmente incorporando urea y otros nutrientes por encima de las necesidades (El-Shazly y col., 1961).

En resumen, la reducción de la celulolisis en dietas concentradas, no puede atribuirse exclusivamente a un efecto de baja tolerancia al pH ácido, provocado por la fermentación de carbohidratos no estructurales. Es un proceso mucho más complejo e intervienen otros factores como preferencia por carbohidratos no estructurales y

competencia por nutrientes esenciales, que van a reducir la celulolisis y las poblaciones celulolíticas.

## **4.2. Degradación de la proteína**

La proteína es un nutriente esencial en la nutrición de todas las especies animales. En los rumiantes, el objetivo de la nutrición proteica es doble, por una parte satisfacer las necesidades de nitrógeno de los microorganismos ruminales, y por otra, aportar aminoácidos al animal. Las necesidades de los microorganismos se pueden cubrir con fuentes de nitrógeno proteico y no proteico, en cambio, las necesidades del animal sólo se pueden cubrir con aminoácidos, que pueden ser de origen dietario o microbiano.

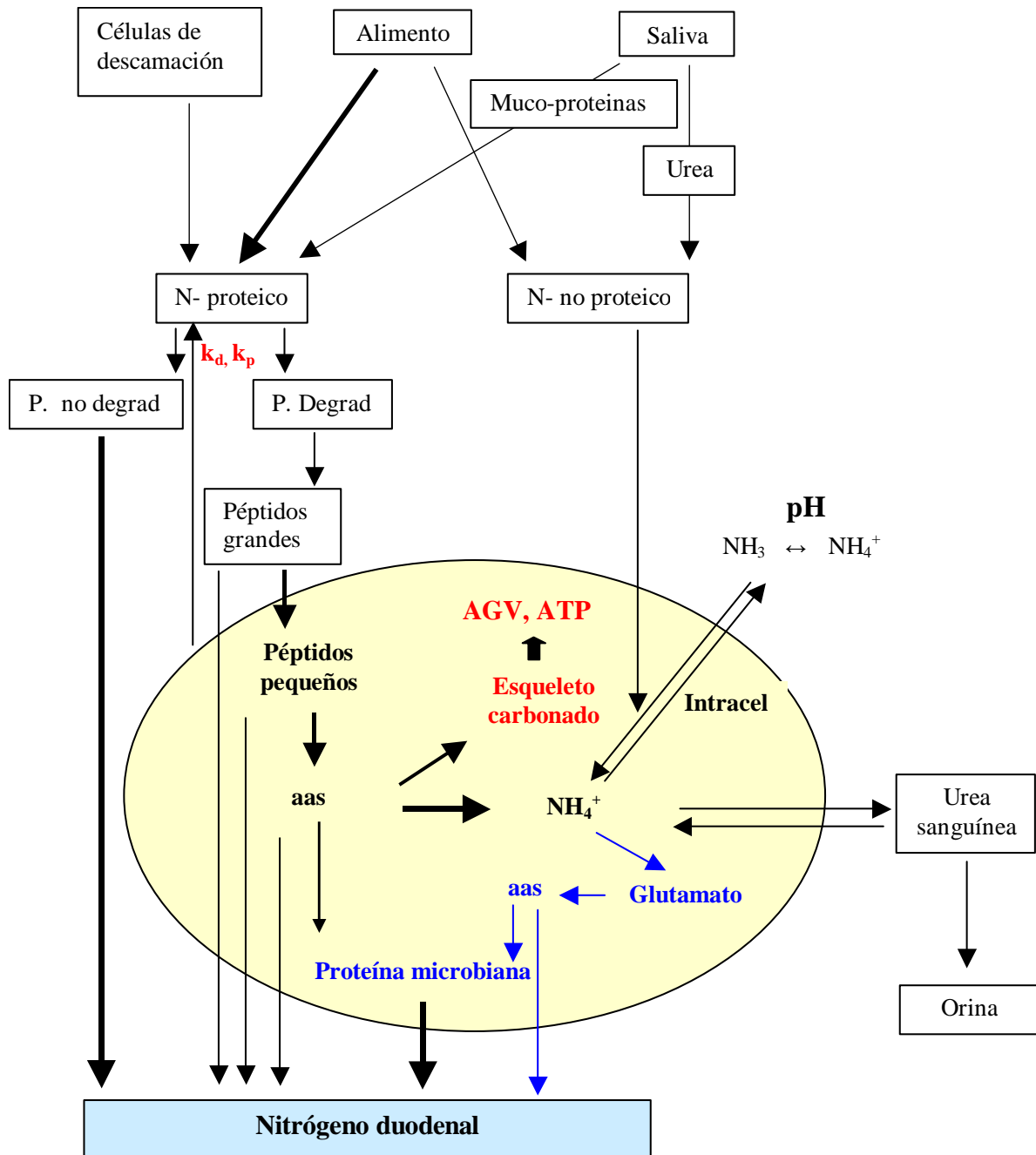
A diferencia de lo que pasa en monogástricos, el perfil y la calidad de los aminoácidos que llega a duodeno es diferente del aportado en la ración, debido a la degradación ruminal de los aminoácidos dietarios y al aporte de proteína microbiana, sintetizada a partir de la energía derivada de los carbohidratos y de compuestos nitrogenados simples (Wallace y Cotta, 1988). Esta proteína microbiana junto con la proteína que escapa de la degradación ruminal es directamente disponible para ser digerida y absorbida por el rumiante.

### **4.2.1. Clasificación de los compuestos nitrogenados que llegan al rumen**

De los aportes nitrogenados hay que diferenciar, en primer lugar entre las fuentes exógenas procedentes del alimento y las fuentes endógenas aportadas por el propio rumiante. Después hay que hacer una segunda clasificación, donde estos compuestos nitrogenados tanto dietarios como endógenos, se dividen en proteicos y no proteicos (NNP). De los aportes dietarios, la proteína verdadera es la fracción más importante, mientras que el contenido de compuestos no proteicos es minoritario y dependerá del tipo de alimento. Entre los aportes endógenos, las muco-proteínas salivares y las células de descamación epitelial son fuentes de proteína verdadera, y la urea de nitrógeno no proteico. Los aportes endógenos son importantes *in vivo*, al hacer balances de nitrógeno, porque el nitrógeno duodenal puede ser más alto que el ingerido (Ørskov, 1992).

La proteína verdadera, tanto endógena como exógena, se puede clasificar en degradable y no degradable (Figura 8). La degradable aportará péptidos, aminoácidos y amoníaco a los microorganismos ruminales y la no degradable aportará péptidos y aminoácidos directamente al animal. La proporción de proteína degradable y no degradable en un alimento dependerá del ritmo de degradación de la proteína y del

tiempo de permanencia en el rumen, por lo que no hay un valor único para cada ingrediente.



**Figura 8.** Degradación y fermentación de los compuestos nitrogenados que llegan al rumen ( $k_d$ , ritmo de degradación;  $k_p$ , ritmo de paso) y síntesis de proteína microbiana.

#### 4.2.2. Proceso de degradación de los compuestos nitrogenados

La hidrólisis de la proteína en el rumen es un proceso complejo de varias etapas. En primer lugar se solubiliza la fracción soluble; después se adhieren los microorganismos a la proteína insoluble y en ese punto la cadena peptídica es atacada por diversas exo y endo-proteasas, liberándose péptidos y aminoácidos. Estos péptidos y aminoácidos libres serán absorbidos rápidamente por los microorganismos para ser incorporados directamente a la síntesis proteica o para ser descarboxilados y desaminados produciendo AGV, CO<sub>2</sub> y amoníaco (Owens y Zinn, 1988).

Este proceso se dividirá en las fases de proteolisis, peptidolisis y metabolismo de aminoácidos.

##### 4.2.2.1. Proteolisis

Las bacterias son las principales responsables de la degradación de la fracción soluble de la proteína y probablemente de la proteína en general. Su principal actividad proteolítica es del tipo cisteína proteasa, tanto en dietas forrajeras como concentradas (McAllister y col., 1993; Wallace, 1991).

En general, la actividad proteolítica de las bacterias es débil, y es la acción conjunta y sinérgica de todas estas especies de baja actividad que hace que la proteolisis se realice eficientemente en el rumen (Wallace, 1991). Entre el 30-50 % de las bacterias ruminales tienen actividad proteolítica, exceptuando las principales bacterias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*) (Wallace y Cotta, 1988), pero muy pocas cepas son estrictamente proteolíticas (Hungate, 1966). Las especies proteolíticas más importantes, ante diferentes condiciones de alimentación, son *Ruminobacter amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, y *Streptococcus bovis* (Yokohama y Johnson, 1988).

Las enzimas proteolíticas se localizan periplasmáticamente, asociadas a la membrana celular, excepto en *Butyrivibrio fibrisolvens* que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace y Cotta, 1988). Para degradar la proteína insoluble, las bacterias deben adherirse al sustrato, por lo que tendrán rápido acceso a los productos de degradación (Owens y Zinn, 1988).

*Ruminobacter amylophilus* además de tener actividad proteasa también tiene actividad amilolítica, por lo que es de particular importancia en dietas ricas en almidón. Su función proteolítica se basa en degradar las proteínas estructurales dentro del grano

de cereal, para exponer el almidón para su degradación, sin ser capaz de utilizar los péptidos y aminoácidos formados (Cotta y Hespell, 1986). *Butyrivibrio fibrisolvens* puede ser la bacteria proteolítica predominante en determinados animales, y aumenta su importancia cuando la dieta es rica en proteína poco degradable. Puede incorporar péptidos y aminoácidos preformados directamente a su síntesis proteica que actúan como estimuladores de la misma (Cotta y Hespell, 1986). Probablemente la bacteria proteolítica más abundante en todo tipo de dietas sea *Prevotella ruminicola*, que tiene varias actividades proteolíticas y, aunque puede incorporar péptidos de un determinado tamaño directamente a su síntesis proteica, es incapaz de utilizar aminoácidos libres (Cotta y Hespell, 1986). *Streptococcus bovis* se considera un microorganismo oportunista, y tiene muy baja actividad proteolítica, pero es de destacar su alta actividad leucina aminopeptidasa y di- y tripeptidasa, por lo que su actividad proteolítica parece ser secundaria para degradar los productos de otras especies proteolíticas (Wallace, 1991).

Las bacterias asociadas a la pared ruminal, también tienen una alta capacidad proteolítica. Aunque contribuyen poco en la degradación de la proteína dietaria, son responsables de la degradación de las células de descamación del epitelio ruminal. Estas descamaciones pueden llegar a representar 6,6 g N/día (Ørskov y McLeod, 1982) y al estar queratinizadas no pueden ser digeridas por el hospedador (Cheng y Costerton, 1980).

La actividad proteolítica de los protozoos es diez veces menor que la bacteriana, en condiciones de pH 6-7. Su principal actividad también es del tipo cisteína proteasa y tienen mayor actividad aminopeptidasa y de tripsina que las bacterias (Forsberg y col., 1984). Su actividad proteasa es intracelular, por lo que su principal sustrato serán proteínas asociadas a un determinado tamaño de partícula que puedan ser engullidas fácilmente, como los cloroplastos y las bacterias, y prácticamente no intervienen en la degradación de proteínas solubles. Al ser las bacterias su principal fuente proteica, los protozoos determinan el reciclaje de N ruminal. En presencia de protozoos el reciclaje bacteriano es del orden de 2,4-37 %/h, en cambio en animales defaunados se reduce hasta un 0,3-2,7 %/h (Wallace y McPherson, 1987).

Los hongos como *Neocallimastix frontalis*, tienen alta actividad proteolítica extracelular del tipo metaloproteasa (Wallace, 1991). Desarrollan su actividad en las partículas vegetales a las que se asocian establemente en el proceso de degradación de la pared celular (Wallace y Cotta, 1988).

Los péptidos liberados en esta fase son detectados en bajas concentraciones en el líquido ruminal, lo que indica que son reutilizados o degradados muy rápidamente en los procesos de peptidolisis y desaminación (Owens y Zinn, 1988). En determinadas condiciones, si la velocidad de proteolisis excede la peptidolisis, se pueden acumular y abandonar el retículo-rumen vehiculados a la fase líquida (Broderick y Wallace, 1988), aunque lo normal es que sean degradados rápidamente, aumentando la concentración de aminoácidos y amoníaco a los pocos minutos después de la ingestión (Chen y col., 1987).

#### **4.2.2.2. Peptidolisis**

Las cadenas de polipéptidos resultantes de la hidrólisis de las proteínas son degradadas por la acción de las peptidasas microbianas hasta péptidos más pequeños y finalmente hasta aminoácidos (Cotta y Hespell, 1986). La peptidolisis es mayoritariamente bacteriana, asociada a la membrana celular, por lo que los oligopéptidos formados podrán ser utilizados por la misma bacteria o pasar al medio ruminal y ser el substrato nutritivo para otras especies bacterianas que no tienen esta actividad. También se han descrito bacterias que secretan peptidasas extracelularmente, liberando todos los productos de degradación al medio. Posiblemente la acción de estas exopeptidasas sea acceder a otros substratos como el almidón que pueden estar protegidos por una matriz proteica (Cotta y Hespell, 1986). Otras especies degradan los péptidos pequeños intracelularmente y utilizan los productos de degradación para su propia síntesis proteica o bien los secretan extracelularmente (Nolan, 1993).

Los péptidos más pequeños y los aminoácidos entran al interior celular para ser degradados hasta amoníaco o para ser incorporados directamente a la síntesis proteica. La mayoría de bacterias prefieren los péptidos a los aminoácidos libres, posiblemente porque los péptidos son transportados más eficientemente a través de la membrana celular. La eficiencia es inversamente proporcional a la longitud de su cadena y también porque los transportadores de los péptidos deben ser menos específicos que los de los aminoácidos (Payne, 1983; Wallace y Cotta, 1988). El ritmo de captación de péptidos parece ser el punto limitante en la degradación proteica, siendo la secuencia de la cadena de aminoácidos la característica más limitante, más que la longitud de la cadena per sé (Chen y col., 1987).

Los protozoos tiene gran actividad dipeptidasa, y en animales defaunados proliferaran bacterias con actividad dipeptidasa para cubrir esta función (Wallace, 1991).

#### 4.2.2.3. Metabolismo de aminoácidos

La mayoría de aminoácidos se producen intracelularmente tras la degradación de péptidos pequeños, por lo que su nivel en el líquido ruminal es muy bajo, a excepción de una hora después de comer que su concentración puede aumentar (Wallace y Cotta, 1988). Los aminoácidos libres presentes en el líquido ruminal proceden mayoritariamente de la lisis de microorganismos (Nolan, 1993) y de la síntesis microbiana. La alanina se sintetiza al haber un exceso de amoniaco y actúa como reserva de nitrógeno y piruvato (Erfle y col., 1977).

Los aminoácidos se pueden metabolizar mediante descarboxilación, transaminación o desaminación no oxidativa (Tamminga, 1979). Esta última vía es la mayoritaria, seguida de la descarboxilación de los cetoácidos, para producir AGV, dióxido de carbono y amoniaco. En condiciones normales, la descarboxilación de aminoácidos para formar aminas es poco importante, pero puede cobrar importancia en condiciones de pH ácido (Tamminga, 1979). La velocidad de desaminación de aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, hasta amoniaco es rápida por lo que vendrá limitada por la velocidad de captación de péptidos y aminoácidos por los microorganismos (Hino y Russell, 1985).

Durante la desaminación no oxidativa y descarboxilación de los cetoácidos se produce muy poca energía, por lo que no es el principal producto de la reacción (Cotta y Hespell, 1986). Es mucho más importante la producción de amoniaco, principal fuente de nitrógeno para la síntesis microbiana y la producción de AGVR (isovalerato, 2-metilbutirato y isobutirato, formados a partir de los aminoácidos leucina, isoleucina y valina, respectivamente). Los AGVR son esenciales para la síntesis de aminoácidos ramificados y para el crecimiento de las especies celulolíticas (Wallace y Cotta, 1988).

En los protozoos ciliados, los aminoácidos resultantes de la proteolisis intracelular podrán ser excretados al exterior, incorporados a su síntesis proteica, o bien desaminados en un proceso similar al bacteriano (Wallace y Cotta, 1988). La mayoría de especies de protozoos tienen una actividad desaminasa 3 veces más alta que la bacteriana (Forsberg y col., 1984; Hino y Russell, 1985; Cotta y Hespell, 1986). Por esta razón, y porque pueden llegar a representar un alto porcentaje de la biomasa



ruminal, en la defaunación se reducen los niveles de amoníaco ruminales (Wallace y Cotta, 1988).

#### **4.2.2.4. Degradación de compuestos nitrogenados no proteicos**

El nitrógeno no proteico puede entrar en el rumen, de forma exógena (amoníaco, ácidos nucleicos, aminoácidos libres, péptidos de cadena corta, urea, aminas o amidas) a través del alimento, o por reciclaje de la urea endógena. Los alimentos más ricos en compuestos nitrogenados no proteicos son los forrajes, especialmente los conservados y la cantidad presente dependerá de una serie de factores como la edad, variedad y especie, fertilización, temperatura, intensidad de la luz, fotoperiodo y disponibilidad de agua (Hegarty y Peterson, 1973).

La urea endógena puede entrar vía salivar o por difusión pasiva a través del epitelio ruminal. Aproximadamente el 85% de la urea que entra en el rumen lo hace por difusión pasiva y depende de la concentración de urea plasmática y de amoníaco ruminal. El reciclaje vía salivar dependerá de la secreción de saliva, siendo mayor en dietas con forraje grosero, sin correlacionarse con la concentración de urea sanguínea (Ørskov, 1992).

##### **4.2.2.4.1. Urea**

La urea es degradada rápidamente a amoníaco por la acción de la ureasa. Esta enzima es mayoritariamente de origen bacteriano y está presente en dos tipos de poblaciones; una población de bacterias anaeróbicas estrictas asociadas a la fase líquida que degradarán principalmente la urea dietaria y salivar; y otra población de bacterias anaeróbicas facultativas con actividad ureasa muy específica, localizadas en la pared ruminal y que degradarán mayoritariamente la urea que llega a través del epitelio ruminal (Wallace y Cotta, 1988). Esta segunda población juega un papel importante en el reciclaje endógeno. Su intensa actividad ureolítica favorece un gradiente de urea negativo en las proximidades de la pared y favorece la entrada de urea por difusión pasiva. Su actividad ureasa es controlada por los niveles de amoníaco y de urea ruminales. El amoníaco inhibe la actividad ureasa y la urea la estimula. Por tanto, cuando la concentración de amoníaco es baja, aumenta el reciclaje (Cheng y Costerton, 1980; Czerkawsky y Breckenridge, 1982; Wallace y Cotta, 1988).

Estos mecanismos de autorregulación a través de la actividad ureasa, de la permeabilidad de las paredes ruminales y del reciclaje endógeno, ayudan a evitar

aumentos en la concentración de amoníaco, producido rápidamente después de la ingestión de grandes cantidades de urea, que puede llegar a ser tóxico.

### **4.2.3. Factores que afectan a la degradación de la proteína en el rumen**

La proteína no se degrada completamente en el rumen, y el grado de degradación dependerá de la proporción de proteína susceptible de ser degradada, del ritmo de degradación y del tiempo de permanencia en el rumen (Ørskov y McDonald, 1979). La estimación de la degradación no es fácil, ya que está influida por muchos factores, que se pueden agrupar en factores relacionados con el alimento y factores relacionados con el medioambiente ruminal, muy determinado, a su vez, por la dieta. Hay diversos métodos para estimarla que se describen en el apartado 4.2.4.

#### **4.2.3.1. Factores relacionados con el alimento**

##### **4.2.3.1.1. Solubilidad**

Chalmers y Synge (1954) observaron que la solubilidad determinaba la degradabilidad de algunas proteínas. Posteriormente, se ha demostrado que la solubilidad es un buen estimador cuando la fracción degradable es únicamente la soluble, pero no cuando hay una fracción no soluble y degradable. Estudios recientes han demostrado que la fracción soluble puede degradarse rápida o lentamente, y que la fracción insoluble se degrada a diferentes velocidades, por eso la solubilidad no puede considerarse sinónimo de degradabilidad (Stern y col., 1997).

##### **4.2.3.1.2. Estructura proteica**

La estructura proteica y la presencia de enlaces disulfuro parece determinar la degradabilidad ruminal en mayor medida que la solubilidad (Wallace y Kopècný, 1983). La ovoalbúmina, tiene una baja degradación ruminal, debido a que tiene una estructura primaria atípica que no puede ser atacada por las exoproteasas microbianas (Cotta y Hespell, 1986).

Los suplementos proteicos son más difíciles de estudiar que las proteínas, porque intervienen muchas otras estructuras no proteicas en la degradación. Ganev y col. (1979) observaron que las proteínas en determinados suplementos proteicos vegetales estaban protegidas por estructuras fibrosas que pueden limitar el acceso de los microorganismos proteolíticos al sustrato.

#### 4.2.3.2. Condiciones ruminales

La alimentación, concretamente la relación forraje:concentrado, es el factor externo más determinante de las condiciones ruminales y del tipo de fermentación, por lo que tendrá una alta influencia sobre la actividad proteolítica. La actividad proteolítica varía en función de la dieta y de la naturaleza de la proteína del alimento, posiblemente por cambios en las poblaciones microbianas (Wallace, 1991).

##### 4.2.3.2.1. pH

Disminuciones en el pH ruminal, suelen asociarse con disminuciones en la degradabilidad de la proteína. Sin embargo, el pH óptimo para la proteólisis (5,5-7) se encuentra dentro del rango normal de pH ruminal, por lo que el descenso en la proteólisis por el pH ácido no se debe a una inhibición enzimática.

Al igual que pasaba con la inhibición de la celulolisis, el pH ácido puede actuar disminuyendo el número de algunas cepas bacterianas capaces de degradar péptidos y desaminar aminoácidos, como demostraron los trabajos *in vitro* de Erfle y col. (1982). Esta reducción en determinadas poblaciones bacterianas puede deberse a problemas de adhesión de las bacterias al substrato y a descensos en el tiempo de retención ruminal (Shiver y col., 1986). Otros investigadores han atribuido esta disminución de la degradación, a descensos en la solubilidad proteica a pH ácido (Preston y col., 1963; Loerch y col., 1983).

##### 4.2.3.2.2. Ritmo de paso y tiempo de retención ruminal

El rumen es un sistema de flujo continuo, donde la cantidad de alimento y fluido que sale es similar a la que entra. Por eso el ritmo de paso se verá afectado por los siguientes factores (Ørskov, 1992):

- a) Nivel de alimentación. Aumentos en la ingestión se han asociado con aumentos en el ritmo de paso de líquidos, partículas y específicamente de los suplementos proteicos, lo que disminuirá el tiempo de retención ruminal repercutiendo negativamente sobre la degradabilidad efectiva (Tamminga, 1979; Ørskov, 1992; Ganev y col., 1979; Eliman y Ørskov, 1984).
- b) Frecuencia de distribución de alimento. Warner (1981) en una revisión sobre dinámica de tránsito, concluyó que el tiempo de retención disminuía al aumentar la frecuencia de alimentación, pero Eliman y Ørskov (1985)

no encontraron diferencias en el ritmo fraccional de paso de los suplementos proteicos al variar la frecuencia de alimentación.

- c) Tamaño de partícula. En términos generales, descensos en el tamaño de partícula, provocan descensos en el tiempo de retención ruminal, ya que las partículas pequeñas pueden abandonar antes el rumen por el orificio retículo-omasal (Eliman y Ørskov, 1984).
- d) Relación forraje:concentrado. En dietas mixtas, incrementos de hasta un 30% de concentrado aumentan el ritmo de paso, mientras que por encima de esta proporción generalmente lo disminuyen. Esta disminución es debida a cambios en la población ruminal y a descensos en la degradación de la fibra, causados por la acidificación del pH. Sin embargo, el efecto de la relación forraje:concentrado sobre el ritmo de paso vendrá más determinado por el nivel de ingestión y por la calidad del forraje (Ørskov, 1992).
- e) Otros factores como el estado fisiológico, la adición de tampones ruminales o la temperatura ambiental. Durante la gestación el ritmo de paso suele aumentar, debido a una reducción en el volumen ruminal por compresión del útero grávido; la adición de tampones ruminales tiene un efecto variable sobre la digestibilidad ruminal y el ritmo de paso dependiendo de la composición de la dieta base; y en cuanto a la temperatura ambiental, temperaturas altas incrementan el tiempo de retención (Warren y col., 1974), pero el efecto variará con el rango de temperatura utilizado y con el tipo de dieta (Kennedy, 1985).

#### 4.2.3.2.3. Concentración de productos de la fermentación

Sería muy ventajoso si el amoniaco, como producto final de la degradación proteica, pudiera regular el proceso: inhibiéndolo a altas concentraciones y estimulándolo al estar en baja concentración. Sin embargo, esta regulación por producto final no pudo ser demostrada por Nikolić y Filipovic (1981) en incubaciones *in vitro*. Es más, observaron que bajas concentraciones de amoniaco, pueden inhibir la degradación de la proteína, por un efecto negativo sobre el crecimiento microbiano.

Altas concentraciones de ácidos grasos libres puede reducir la proteolisis (Ørskov, 1992), posiblemente por un efecto tóxico sobre poblaciones sensibles al pH.

#### 4.2.3.3. Degradación proteica en dietas concentradas

La actividad proteolítica ruminal es más alta en dietas concentradas que forrajeras, porque los microorganismos proteolíticos son mayoritariamente amilolíticos (France y Siddons, 1993). Pero esta mayor actividad proteolítica no siempre conlleva una mayor degradabilidad efectiva ya que disminuciones en el pH ruminal o aumentos en el ritmo de paso pueden reducir la degradación efectiva de la proteína en el rumen.

Además de los factores discutidos anteriormente, hay que remarcar que la degradabilidad de los suplementos proteicos vegetales también puede reducirse por un efecto indirecto de la fermentación de los carbohidratos rápidamente degradables sobre la degradación de la fibra. Ganev y col. (1979) propusieron que la proteína de fuentes vegetales estaba íntimamente ligada a la celulosa, por lo que la pared celular puede actuar como un mecanismo de protección frente a la degradación de la proteína. La fibra tiene que ser degradada para que las bacterias proteolíticas puedan acceder al sustrato. Por eso la proteólisis se verá reducida indirectamente en todas las condiciones ruminales que conlleven una reducción de la actividad fibrolítica, comentados en el apartado 4.1.3. Aparte del efecto directo del pH y el ritmo de paso sobre la proteólisis, también tendrá un efecto indirecto mediado a través de la celulolisis (Ørskov, 1992).

En la tabla 6 se recopilan varios estudios donde al analizar el efecto de la relación forraje:concentrado sobre la degradación proteica por la técnica *in situ*, se han encontrado resultados muy diversos, dependiendo de la relación forraje:concentrado de las dietas y de los suplementos incubados.

#### 4.2.4. Métodos de estimación de la degradabilidad proteica

A partir de la aplicación del sistema de proteína metabolizable, la degradabilidad ruminal de la proteína es uno de los puntos críticos en el cálculo de las recomendaciones proteicas en los actuales sistemas de alimentación (INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 1996). Estos sistemas tienen que dar un valor de degradabilidad ruminal para cada alimento que, como se describió en el apartado anterior, variará dependiendo de sus características propias y de las condiciones ruminales, así como del método de estimación utilizado (Nocek, 1988; Huntington y Givens, 1995; Stern y col., 1997).

**Tabla 6.** Efecto de la relación forraje:concentrado sobre la degradación proteica de suplementos vegetales incubados *in situ* (F:C, relación forraje:concentrado; DE, degradabilidad efectiva; kp, ritmo de paso).

Referencia	F:C de las dietas	Suplemento	DE	P-valor F:C
Lindberg, 1981 (kp = 0,05/h)	30:70 vs. 70:30	Harina de soja	54 vs. 57	NS
Devant y col., 2000 (kp = 0,06/h)	6:94 vs. 60:40	Harina de soja	41 vs. 58	< 0,05
Woods y col., 2002 (kp = 0,05/h)	25:75 vs. 75:25	Harina de soja	57 vs. 55	NS
		Harina de pescado	42 vs. 43	NS
		Cascarilla de soja	50 vs. 49	NS
Molero y col., 2004 EXP1 (kp = 0,06/h)	15:85 vs. 75:25	Harina de soja	65 vs. 72	< 0,05
		Harina de pescado	52 vs. 57	< 0,01
		Altramuz	85 vs. 86	< 0,01
		Guisante	82 vs. 86	< 0,01
Molero y col., 2004 EXP2 (kp = 0,06/h)	37:63 vs. 62:38	Harina de girasol	80 vs. 83	< 0,05
		Harina de soja	64 vs. 71	< 0,01
		Guisante	88 vs. 88	NS
		Altramuz	84 vs. 84	NS
		Harina de girasol	82 vs. 85	< 0,05

#### 4.2.4.1. *In vivo*

Es el método de referencia con el que se comparan todos los otros métodos. Para estimar la degradabilidad proteica mediante este método se necesitan animales provistos con cánula en el intestino proximal, con las complicaciones experimentales que esto conlleva.

Pueden diferenciarse dos métodos (Ørskov, 1992):

- Método diferencial. Se estima el nitrógeno dietario que llega al intestino proximal por diferencia entre el nitrógeno no amoniacal y el bacteriano, que se identifica mediante marcadores. Al calcular el nitrógeno no degradado por diferencia, se comete un error equivalente al de la determinación de la proteína microbiana.
- Método de incremento de la concentración proteica. Consiste en aumentar la inclusión del ingrediente a estudiar en una dieta base isofermentable y que su contenido nitrogenado no limite la síntesis microbiana. El incremento en el flujo de proteína duodenal se atribuye totalmente al ingrediente testado.

La principal limitación de los métodos *in vivo* es que están sujetos al error de los marcadores utilizados para la estimación del ritmo de paso y para diferenciar la proteína

dietaria de la microbiana. De la misma forma, los resultados son difícilmente extrapolables a otras condiciones experimentales. Al ser tan laboriosos y caros, no pueden utilizarse para determinaciones de degradabilidad proteica a gran escala. Por eso se necesitan otros métodos para dar valores, aunque sólo sean comparativos, bajo unas mismas condiciones de estandarización.

#### 4.2.4.2. *In situ*

Esta técnica consiste en incubar el substrato a estudiar en bolsas que se introducirán en el rumen de animales canulados. Las bolsas con el suplemento se incuban durante un número creciente de horas y así se obtiene una descripción de la degradación.

Esta técnica surgió para estudiar la degradación de la fibra, mediante la incubación en bolsas de seda (Quin y col., 1938), que posteriormente fueron substituidas por materiales sintéticos totalmente resistentes a la degradación. Mehrez y col. (1977) sugirieron la utilización de esta técnica como método de rutina para estimar la velocidad de degradación de suplementos proteicos y actualmente es el método más utilizado para estimar la degradación microbiana de la proteína en el rumen.

Tiene la ventaja ante los métodos *in vitro* que tiene en cuenta los procesos digestivos del rumen en funcionamiento. Aunque con limitaciones (las muestras no sufren el proceso de masticación y rumia), no hay ningún método *in vitro* que haya logrado substituirlo (Stern y col., 1997) y es más barato que los métodos *in vivo*.

Muchos factores, además de la actividad microbiana, afectan a la desaparición del ingrediente incubado en las bolsas. Estos factores hacen referencia a:

- a. Animal, especie, dieta que recibe y nivel de alimentación.
- b. Procesado del substrato (molido), que simule al máximo las condiciones de masticación y rumia.
- c. Bolsa de incubación (tamaño de poro, relación muestra:superficie), tiene que asegurar las mismas condiciones de fermentación dentro de la bolsa que en el rumen, sin que se escapen partículas de substrato sin degradar.
- d. Condiciones de incubación, método de colocación de las bolsas en el rumen y localización. Lo único desaconsejable parece ser la introducción en un recipiente rígido.
- e. Tiempos de incubación, que describan correctamente la curva de degradación característica de cada substrato.

- f. Número de réplicas necesarias, Mehrez y col. (1977) recomendaron incubar una misma muestra en tres animales, en dos periodos para obtener una buena repetibilidad.
- g. Tratamientos postincubación, método de lavado de las bolsas y corrección por contaminación microbiana.

Numerosos trabajos han estudiado estos factores, y han intentado estandarizar la técnica para reducir la variación (Lindberg, 1985; Nocek, 1988; Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992; Ørskov, 1992; Madsen y Hvelplund, 1994; Wilkerson y col., 1995), sin embargo, sigue habiendo variación entre los autores. Los principales puntos de estandarización de estos trabajos están resumidos en la Tabla 7.

En estos momentos las mayores fuentes de variación, por una baja estandarización del método, parecen estar en el procesado postincubación. Concretamente, en el lavado y en las correcciones por contaminación microbiológica (Wilkerson y col., 1995; Vanzant y col., 1998). El método de lavado no ha progresado mucho, desde que Balch y Johnson recomendaran en 1950 lavarlas a mano debajo del grifo hasta que el agua saliera clara. Sin embargo, muchos autores recomiendan estandarizar el lavado mediante el uso de una máquina automática o semi-automática, donde las bolsas sufren un mismo número de ciclos de lavado de una misma duración.

En cuanto a la corrección por la contaminación microbiana, puede representar un gran error de subestimación de la degradabilidad proteica, al aumentar el nitrógeno residual. La contaminación microbiana de los residuos incubados variará dependiendo de:

- a. Contenido en nitrógeno del sustrato, siendo la contaminación muy alta en alimentos con bajo contenido proteico y baja degradabilidad (Varvikko y Lindberg, 1985; Wanderley y col., 1993).
- b. Tiempo de incubación, siguiendo una evolución cuadrática en función del sustrato disponible para adherirse (Nocek, 1985; Wanderley y col., 1993).
- c. Marcador utilizado para medir el residuo microbiano, recomendando el  $N^{15}$  por encima del ácido diamino pimélico (Sadik y col., 1990).

A pesar del error cometido por la contaminación bacteriana, puede no ser recomendable eliminar los microorganismos adheridos a los residuos de incubación, ya que los métodos disponibles pueden favorecer la pérdida de sustrato, sobreestimando la degradabilidad (Olubobokun y col., 1990).



**Tabla 7.** Factores de estandarización de la técnica *in situ* por diversos autores (Adaptado de Vanzant y col. 1998).

Factor de estandarización	Referencia						
	Lindberg (1985)	Nocek (1988)	Ørskov (1992)	Michalet-Doreau y Ould-Bah (1992)	AFRC (1993)	Madsen y Hvelplund (1994)	Wilkerson y col. (1995)
<b>Animal</b>							
Especie	Vacuno	La de aplicación	Ovino, vacuno	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>	Vacuno, ovino, cabra	Vacuno
Dieta base (F:C)	50:50	La de aplicación	La de aplicación	La de aplicación	60:40	67:33	Forrajera
Nivel de alimentación	Mantenimiento	<i>Ad libitum</i>	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>	Mantenimiento	Mantenimiento	NE <sup>a</sup>
<b>Muestra, procesado</b>							
Concentrados	1-2 mm	2 mm	2,5-3 mm	1,5-3 mm	2,5 mm	1,5-2,5 mm	2 mm
Forrajes	1-2 mm	5 mm	2,5-5 mm	1,5-5 mm	4 mm	1,5-2,5 mm	2 mm
<b>Bolsa</b>							
Material	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster	Poliéster
Tamaño de poro	20-40 µm	40-60 µm	20-40 µm	40-60 µm	40-50 µm	30-50 µm	53 µm
Peso:superficie	10-15 mg/cm <sup>2</sup>	10-20 mg/cm <sup>2</sup>	12-20 mg/cm <sup>2</sup>	15 mg/cm <sup>2</sup>	12 mg/cm <sup>2</sup>	10-15 mg/cm <sup>2</sup>	12,5 mg/cm <sup>2</sup>
<b>Replicas</b>							
Nº de animales	3-4	NE <sup>a</sup>	2-4	NE <sup>a</sup>	3	3	1-4
Nº de días	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>	1-2	NE <sup>a</sup>	1	1	1-4
Nº de bolsas	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>	1-4	NE <sup>a</sup>	1	2	1-8
<b>Preincubación</b>	NE <sup>a</sup>	Remojo	NE	NO	NO	NE <sup>a</sup>	Remojo
<b>Incubación</b>							
Localización	Saco ventral	NE <sup>a</sup>	Fase líquida/sólida	NE <sup>a</sup>	Fase líquida	NE <sup>a</sup>	Saco ventral
Inserción/retirada simultánea	NE <sup>a</sup>	Retirada	Inserción	Inserción	Cualquier orden	Inserción	Retirada
h de incubación	2, 4, 8, 16, 24 (48 F)	6-12 ptos (0-24h)	2, 6, 12, 24, 36	NE <sup>a</sup>	2, 6, 8, 24, 48 (72 F)	0, 2, 4, 8, 16, 24, 48	16 h
<b>Postincubación</b>							
Lavado	A mano	A mano	A mano	NE <sup>a</sup>	A máquina	A máquina	A mano
Corrección microbiana	NE <sup>a</sup>	SÍ (forrajes)	SÍ	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>	NE <sup>a</sup>

<sup>a</sup>NE = No especificado

La corrección por pérdida de pequeñas partículas está menos considerada en los métodos de estandarización. Estas pérdidas variarán considerablemente entre forrajes, cereales y suplementos proteicos (Lindberg, 1985). Al corregir por estas pérdidas, se asume que las partículas que se escapan están compuestas por una fracción indegradable y una degradable, en la misma proporción que las que se quedan en la bolsa y que se degradarán al mismo ritmo que éstas (Dhanao y col., 1999; Hvelplund y Weisbjerg, 2000). Sin embargo, estos supuestos no son siempre ciertos, ya que las partículas que se escapan son las más pequeñas, y aunque no sean solubles se degradarán más rápidamente que las partículas de mayor tamaño, y el error puede ser mayor si se considera que estas pequeñas partículas se degradan al mismo ritmo que las que se quedan en la bolsa, en vez de incluirlas en la fracción soluble (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992).

Viendo todos los factores que afectan a la degradabilidad estimada por la técnica *in situ*, hay que tener en cuenta que no puede haber un único protocolo de estandarización que pueda aplicarse a todos los alimentos, grados de procesamiento o grados de molturación de la muestra.

Esta técnica tiene el inconveniente de la baja repetibilidad de resultados entre laboratorios, e incluso dentro de un mismo laboratorio (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992). Madsen y Hvelplund (1994) estimaron la degradabilidad de la proteína de muestras de unos mismos ingredientes en 23 laboratorios usando una técnica *in situ* estandarizada, y observaron que el rango de la degradabilidad proteica estuvo entre 38,8 y 66,4 %. La variación entre los laboratorios se debió mayoritariamente a diferencias en la preparación de la muestra, el material utilizado para las bolsas y en el análisis del contenido proteico. Vanzant y col. (1998) tras hacer una extensa revisión de trabajos *in situ*, atribuyeron un 40% de la variación al efecto del animal, un 30% al día de incubación y el otro 30% a la bolsa de incubación, aunque la repartición de la variación se verá influida por el tipo de muestra y por el tiempo de incubación. En cambio Wilkerson y col. (1995), atribuyeron la menor variación al efecto del animal y la mayor a las diferencias entre laboratorios y entre días.

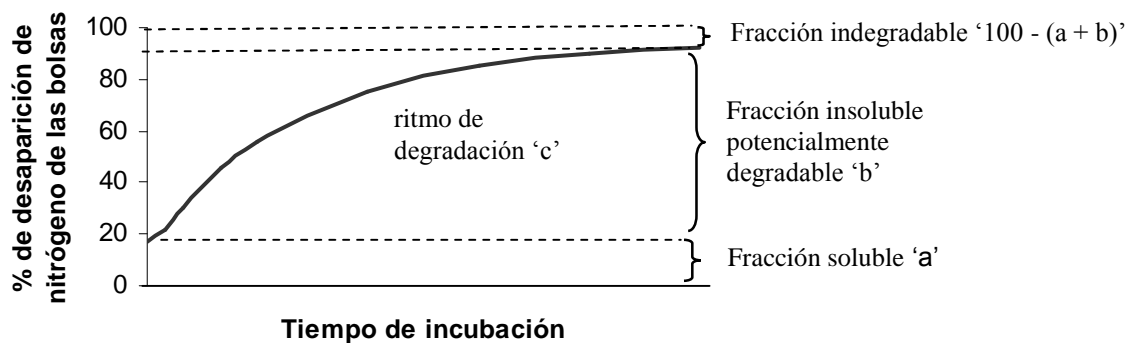
Otra limitación de esta técnica en dietas concentradas fue observada por Weakley y col. (1983); en dietas concentradas la densidad bacteriana es más alta, por lo que las bacterias pueden formar una capa mucosa que bloquee los poros de la bolsa e impedir la entrada de agentes digestivos, por lo que las condiciones dentro de la bolsa no

representarían las condiciones ruminales. En cambio, en dietas forrajeras, el forraje tiene una acción abrasiva sobre la superficie de la bolsa manteniendo los poros limpios.

#### 4.2.4.2.1. Interpretación de los valores de desaparición

Con esta técnica se mide la desaparición del sustrato incubado en la bolsa y se asume que desaparición es igual a degradación.

La degradación de la mayoría de suplementos proteicos describe una curva como la que se muestra en la figura 9, con una fracción soluble que se degrada muy rápidamente (a), y otra fracción insoluble que se degrada más lentamente (b) a un ritmo (c), sin llegar nunca a alcanzar el 100% de degradación.



**Figura 9.** Curva de degradación exponencial, típica de la mayoría de suplementos proteicos.

Se asume que la fracción soluble es degradada total e instantáneamente. Sin embargo, en algunos casos la velocidad de degradación de la fracción soluble es más lenta que la insoluble y proteínas solubles que se degraden muy lentamente pueden escapar del rumen asociadas a la fase líquida (Mahadevan y col., 1980; Wallace y Kopêcný, 1983).

Ørskov y McDonald (1979) ajustaron esta curva a un modelo exponencial:  $P = a + b(1 - e^{-ct})$ , donde P es la cantidad degradada a un tiempo t; a, b y c son las constantes de la ecuación exponencial. Este modelo matemático es el más utilizado para predecir la degradabilidad a un determinado tiempo de incubación, y si se combina con una estimación del ritmo de paso de las partículas, se puede predecir el valor de degradabilidad efectiva mediante la siguiente ecuación:  $DE = a + [(b \times c) / (c + k)]$ , donde k es el ritmo de paso. Cambios en el ritmo de paso afectarían más a suplementos

que tengan una fracción  $b$  muy grande y un ritmo de degradación lento (Ørskov, 1992). Desde esta misma base gráfica han surgido otros modelos para predecir la degradabilidad (Mertens y Loften, 1980; Mathers y Miller, 1981), siendo interesante la aportación de López y col. (1999) que incluyen un nuevo parámetro ‘ $v$ ’, para ajustar la forma de la curva de degradación, típica de cada suplemento, a la ecuación Ørskov y McDonald (1979). Este nuevo parámetro realiza un ajuste más preciso dependiendo de la forma de la curva, desde una sigmoidea a una exponencial de primer orden ( $v = 1$ ):

$$P = a + b (1 - e^{-ct})^{1/v}.$$

#### 4.2.4.2.2. Técnicas simplificadas

El problema de la técnica *in situ*, es que es laboriosa y el coste aumenta al aumentar el número de bolsas a incubar. Para aliviar este problema han surgido variantes a la técnica, que intentan reducir el número de tiempos de incubación manteniendo la misma precisión (Broderick, 1994; Calsamiglia y col., 1994; Vanzant y col., 1996). El problema de estos modelos simplificados es que siguen estimando la degradabilidad directamente de los valores de desaparición de las bolsas, y al tener sólo dos valores, si uno es incorrecto se obtendrá una curva de degradación totalmente incorrecta. Olaisen y col. (2003) ajustaron la desaparición, de estas pocas bolsas incubadas, a un modelo de regresión bilineal, cuya gran ventaja frente a los anteriores es que cada valor de desaparición contribuye a una fracción de la degradabilidad efectiva y un valor erróneo, no conducirá a toda una curva errónea, aunque esta aproximación no permite calcular la velocidad de degradación.

#### 4.2.4.3. *In Vitro*

##### 4.2.4.3.1. Métodos de simulación de la fermentación ruminal

Para solucionar los problemas de la variación animal, y reducir los costes han surgido numerosos métodos *in vitro* que simulan la fermentación ruminal. Los métodos más sencillos son los de Tilley y Terry (1963), que hoy en día sigue siendo el método *in vitro* más utilizado para predecir la digestibilidad ruminal, y la técnica de gas, perfeccionada por Theodorou y col. (1991). Esta técnica mide el gas producido durante la fermentación anaeróbica de los carbohidratos (AGV, CO<sub>2</sub>, metano y H<sub>2</sub>).

Los métodos de simulación más complejos son los fermentadores de cultivo continuo, donde se simulan las condiciones ruminales y se pueden estudiar tanto los factores que afectan a la ecología ruminal, como a la digestión de nutrientes (Hoover y

col., 1976; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Teather y Sauer, 1988; Fuchigami y col., 1989). Estos sistemas tienen la ventaja, frente a la estimación *in vivo*, que son más baratos, más rápidos, con menor variación entre las unidades experimentales y con la posibilidad de controlar el ritmo de paso. Sin embargo, mantienen los inconvenientes de aislar las células microbianas y de diferenciar, mediante marcadores, las fracciones microbianas y dietarias en la proteína del efluente. Los dos modelos más utilizados son el Rusitec, que es un sistema semi-continuo (Czerkawski y Breckenridge, 1977) y el de doble flujo continuo (Hoover y col., 1976). Este último es el que mejor simula las condiciones ruminales, diferenciando dos flujos de salida, de la fracción líquida y de la sólida. Su mayor limitación, frente a los métodos *in vivo*, es no poder simular procesos biológicos, como la incorporación de nitrógeno endógeno (a excepción de la urea salivar), o la absorción ruminal. Además, sufren problemas de defaunación después de periodos largos de incubación. A pesar de esto, es un excelente modelo para estudiar la fermentación microbiana y estimar la degradación ruminal de la proteína, aunque sigue siendo caro y trabajoso, por lo que no es el método indicado como análisis rutinario de la digestión de ingredientes individuales.

#### 4.2.4.3.2. Métodos enzimáticos

La utilización de enzimas proteolíticas tiene un buen potencial para estimar la degradación proteica. Su mayor ventaja es que reducen la variación, ya que son completamente independientes del animal. Pero para ser fiable, las condiciones de incubación deben estar muy bien estandarizadas (tampón pH, duración de la incubación, condiciones de saturación enzimática y temperatura). En suplementos proteicos vegetales la incubación con enzimas proteolíticas puede no ser efectiva ya que el acceso al substrato puede estar limitado por otros componentes como carbohidratos fibrosos o no fibrosos, y deban añadirse enzimas con actividad celulolítica o amilolítica (Nocek, 1988).

Su principal inconveniente es que la interpretación biológica es más limitada ya que se simula una actividad enzimática mucho más simple que la ruminal (Stern y col., 1997). La interpretación todavía es más difícil si las enzimas no son de origen ruminal, ya que las enzimas ruminales pueden tener un mecanismo de acción diferente (Mahadevan y col., 1987). Sin embargo, es un método adecuado para ver diferencias relativas entre alimentos, más que para proponer valores absolutos de digestibilidad (Nocek, 1988).

#### 4.2.4.3.3. Técnicas de inhibición *in vitro*

Broderick (1987) desarrolló un método donde se inhibía la síntesis de proteína microbiana y mediante la concentración de nitrógeno amoniacal, producto final de la degradación, se podía estimar la degradación proteica. Este método dio el mismo ranking de degradación para varios suplementos que la técnica *in situ*, pero el valor de degradabilidad era muy diferente. Posteriormente el método se ha ido perfeccionando utilizando amoníaco marcado con N<sup>15</sup>, para corregir por su incorporación a la proteína microbiana (Hristov y Broderick, 1994).

#### 4.2.5. Estimación de la degradabilidad en los diferentes sistemas de alimentación

El AFRC de 1993, considera el método *in situ* descrito por Mehrez y col. (1977), ajustando los valores de desaparición a la curva exponencial de Ørskov y McDonald (1979), como el mejor método para estimar la degradabilidad de la proteína. Para estimar la degradabilidad efectiva, utiliza unos valores de ritmo de paso estimados a partir del nivel de alimentación, e inicialmente propuestos por el ARC de 1984. Proponen un ritmo de paso de 2 %/h, 5 %/h o 8 %/h, para un nivel de alimentación de L = 1, L = 2 o L = 3, respectivamente. Los terneros de engorde entrarían en el nivel de alimentación L = 2. También propone una ecuación para calcular el ritmo de paso en función del nivel de alimentación, por encima de mantenimiento.

El INRA de 1988, propone para estimar la degradabilidad efectiva de la proteína el método *in situ* estandarizado por Michalet-Doreau y col. (1987), utilizando un ritmo de paso fijo de las partículas del 6 %/h. Asume que la mayoría de animales productivos están alimentados *ad libitum* y que tendrán valores similares de ritmo de paso, aunque considera que la degradabilidad efectiva se sobrestima respecto al método *in vivo*. Las condiciones de estandarización no son las mismas que para el AFRC de 1993, por lo que no son directamente equiparables.

El NRC de 1996 propone valores de degradabilidad (DIP/UIP) que provienen de valores del NRC de 1985 mejorados por el NRC de 1989. Los del NRC de 1985, fueron obtenidos *in vivo* con diferentes dietas y especies animales y los del NRC (1989) fueron obtenidos mediante la técnica *in situ*.

Como se observó en la tabla de estandarización de los métodos *in situ* (Tabla 7) y en las tablas del NRC de 1985, la mayoría de estas estimaciones de degradabilidad han sido obtenidas en dietas forrajeras, y a causa de la gran influencia de la dieta base sobre

la degradación ruminal, los valores propuestos son difícilmente aplicables a condiciones de cebo intensivo, donde la relación forraje:concentrado suele estar cercana al 10:90.

El CNCPS (Sniffen y col., 1992) se basa en las características físico-químicas de los alimentos para estimar la degradabilidad proteica, evitando todos los problemas asociados a las técnicas *in vivo* e *in situ* (animales canulados, estimaciones de ritmo de paso, contaminación microbiana, etc.). Mediante un análisis basado en el sistema detergente propuesto por Goering y Van Soest (1970) y Van Soest y col. (1991) resultan 5 fracciones proteicas, con su correspondiente velocidad de degradación. Una fracción soluble (PA) totalmente degradable; 3 fracciones potencialmente degradables a diferente velocidad (PB1, PB2, PB3) y una fracción indegradable (PC). Para calcular la degradabilidad efectiva, calculan el ritmo de paso de cada alimento en función de la relación forraje:concentrado de la dieta y del nivel de alimentación. Este método es sencillo pero asume que la fracción soluble es totalmente degradable, y que la fracción PC es totalmente indegradable, y ambos supuestos no son ciertos. Por otra parte, los ritmos de degradación de las fracciones B, obtenidos mediante métodos enzimáticos, tienen poca validez biológica (Stern y col., 1997).

## 5. Síntesis de proteína microbiana

Como se ha visto en los apartados anteriores las bacterias fermentan los hidratos de carbono y la proteína dietaria para obtener esqueletos carbonados, energía y compuestos nitrogenados simples para sintetizar proteína propia para su crecimiento. Esta proteína microbiana puede representar entre el 40 y el 100 % de la proteína metabolizable para la nutrición del ganado de carne, disminuyendo al aumentar el contenido en proteína no degradable de la dieta (Owens y Zinn, 1988; Spicer y col., 1986; NRC, 1996). La proteína microbiana es de alto valor biológico y de composición muy constante en dietas muy diferentes (Ørskov, 1992).

En la práctica, la síntesis de proteína microbiana suele medirse como la cantidad de proteína microbiana sintetizada en el rumen que fluye al intestino delgado del rumiante (flujo de proteína microbiana). La síntesis neta y el flujo de proteína al intestino no son equivalentes, debido al reciclaje de proteína en el rumen. También se considera que en su totalidad es de origen bacteriano, porque aunque los protozoos puedan llegar a representar el 40% del nitrógeno microbiano total, quedan secuestrados en el rumen y contribuyen minoritariamente, entre un 10 y un 30 %, al flujo de proteína microbiana que llega a duodeno (Leng, 1982; Veira, 1986). Por otra parte, hay muy

poca información sobre la composición aminoacídica de los protozoos y se considera que es la misma que la bacteriana.

### 5.1. Aportes energéticos

La mayoría de la energía destinada a la síntesis microbiana deriva de la fermentación de carbohidratos. El tipo de carbohidrato fermentado determinará la cantidad de AGV y de células microbianas producidas. Teniendo en cuenta que para todos los carbohidratos hay una limitación termodinámica de la cantidad de energía producida durante la fermentación anaeróbica, aproximadamente el 6,4% de la energía de los carbohidratos no será disponible para el rumiante, sino que se perderá en las reacciones microbiológicas donde los microorganismos generan ATP para su síntesis proteica (Hungate, 1966). Este ATP formado será utilizado con distinta eficiencia para la síntesis de proteína microbiana, por lo que no es posible predecir la producción de masa microbiana a partir de un determinado tipo de fermentación (Ørskov, 1992).

Strobel y Russell (1986) en un estudio *in vitro* observaron que el tipo de carbohidrato, así como la relación entre carbohidratos fibrosos y no fibrosos, tenía poco efecto sobre la eficiencia de síntesis microbiana, la cual si se veía afectada por la velocidad de degradación de los carbohidratos.

### 5.2. Aportes nitrogenados

#### 5.2.1. Amoníaco

Entre el 40 y el 100 % de la proteína microbiana deriva del amoníaco. Esta proporción variará en función de las condiciones ruminales y alimentarias (Stern y Hoover, 1979). En determinadas especies, como las principales bacterias celulolíticas (*Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*) el amoníaco es el único compuesto nitrogenado que pueden incorporar a su síntesis proteica, sin ser capaces de utilizar péptidos y aminoácidos preformados (Bryant y Robinson, 1963; Hungate, 1966).

En la mayoría de casos, el amoníaco es el nexo de unión entre la degradación de la proteína dietaria y la síntesis microbiana. Su concentración ruminal es un ratio entre producción y utilización, lo que dificulta saber cual es la concentración óptima, es decir, la concentración de amoníaco mínima para maximizar el crecimiento microbiano o la velocidad de fermentación del alimento. En la literatura encontramos diferentes valores



que van desde los 3,3 a los 21,5 mg/100 ml (Hoover, 1986). Los estudios más destacados *in vitro* (Satter y Slyter, 1974) con dietas con distinta proporción de forraje, e *in vivo* (Slyter y col., 1979), con dietas concentradas, concluyeron que una concentración de amoniaco en el fluido ruminal entre 2-5 mg/100 ml es suficiente para maximizar el crecimiento bacteriano y la digestibilidad ruminal. Satter y Slyter (1974) también observaron que cuando la concentración amoniaca era inferior a estos niveles, se resentía más la síntesis proteica que la fermentación del alimento. Por lo que a bajas concentraciones amoniaca, puede haber un desacoplamiento entre fermentación y síntesis proteica. Es estos casos, la energía derivada de la fermentación no podrá ser utilizada para el anabolismo proteico, porque no habrá nitrógeno disponible. Kang-Meznarich y Broderick (1981), trabajando también con dietas concentradas, fijaron una mayor concentración (8,5 mg /100 ml) de amoniaco necesaria para maximizar la síntesis proteica.

Mehrez y col. (1977) observaron que el valor óptimo de amoniaco para maximizar la fermentación de ingredientes incubados *in situ* en ovejas alimentadas con dieta a base de cebada, era de 23,5 mg/100 ml, por encima de los propuestos anteriormente para maximizar la síntesis proteica.

La concentración óptima de amoniaco también puede variar en función de la dieta que reciben los animales. Aunque la concentración óptima para los microorganismos es la misma, pueden necesitarse diferentes concentraciones en el líquido ruminal para asegurar que llegue a los microorganismos (ej. las dietas a base de maíz necesitan una concentración inferior que las de cebada) (Wallace y Cotta, 1988).

El amoniaco puede entrar en la célula microbiana por difusión pasiva, en la forma no iónica ( $\text{NH}_3$ ), o por transporte activo de la forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) (Kleiner y Fitzke, 1979). La difusión pasiva es el mecanismo mayoritario y está muy influenciada por la concentración de amoniaco y por el pH ruminal (Russel y Strobel, 1987). La glutamato deshidrogenasa es la enzima más importante que interviene en la captación y fijación de amoniaco que entra de forma pasiva (Chalupa y col., 1970), pero existe una vía alternativa constituida por las enzimas glutamato y glutamina sintetasa, que captan el amoniaco mediante un mecanismo de transporte activo, con gasto de ATP. Este mecanismo de transporte activo es de vital importancia en condiciones ruminales con baja concentración de amoniaco, donde la glutamato deshidrogenasa pierde actividad (Erfle y col., 1977). En dietas ricas en hidratos de carbono no estructurales, donde hay gran disponibilidad de energía, las bajas concentraciones de N amoniaca parecen no

limitar la síntesis de proteína microbiana, en parte por la acción de estos mecanismos de transporte activo que lograrán aumentar la concentración de amoníaco a nivel intracelular en contra de gradiente (Russell y Strobel, 1987), aunque se reduzca la eficiencia de síntesis microbiana (Kang-Meznarich y Broderick, 1981).

Una vez el N amoniacal se ha fijado a un determinado compuesto como el ácido glutámico, se transfiere a un determinado esqueleto carbonado para ir formando todos los aminoácidos (Wallace y Cotta, 1988).

Los protozoos sintetizan su proteína mayoritariamente a partir de aminoácidos preformados, principalmente de origen bacteriano por lo que la síntesis *de novo* a partir de amoníaco no es tan importante como en las bacterias, aunque debe ocurrir (Wallace y Cotta, 1988). En cambio, los hongos dependen del amoníaco para la síntesis de proteína *de novo*, aunque también pueden incorporar directamente aminoácidos a su síntesis proteica (Hoover y Stokes, 1991).

### 5.2.2. Péptidos y aminoácidos preformados

Aunque la mayoría de proteína microbiana se sintetiza a partir del amoníaco, y los rumiantes puedan sobrevivir únicamente con fuentes de nitrógeno no proteico, estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, han observado un aumento en la síntesis de proteína microbiana al sustituir parte del aporte nitrogenado en forma de amoníaco por aminoácidos y péptidos. No hay que olvidar que aunque las únicas fuentes nitrogenadas de la dieta sean no proteicas, las proteínas endógenas y el reciclaje microbiano constituyen un aporte continuo de aminoácidos preformados (Firkins, 1996).

Sin embargo, esta respuesta positiva de los péptidos sobre el crecimiento microbiano, sólo se observa cuando los carbohidratos están en exceso y su fermentación es rápida, es decir, en dietas concentradas (Van Kessel y Russel, 1996). Cuando el nitrógeno es limitante y hay muchos carbohidratos disponibles, las bacterias los fermentan y la energía producida la destinan a sintetizar carbohidratos de reserva que almacenarán intracelularmente o los secretarán al exterior, ya que el exceso de ATP reduce la viabilidad celular (Russell, 1998). Pero si se dispone de péptidos y aminoácidos preformados, los podrán incorporar directamente a su síntesis proteica, y no se destinará energía a procesos no relacionados con el crecimiento celular, como la síntesis de polisacáridos. Es más, los péptidos son más utilizados que los aminoácidos posiblemente por tener un inferior coste de transporte hacia el interior celular, más que por una reducción en su coste de biosíntesis (Demeyer y Van Nevel, 1986; Cotta y

Russell, 1982). Russell y col. (1983) observaron en una serie de estudios *in vitro*, que al aumentar la adición de carbohidratos rápidamente fermentescibles disminuye la concentración de nitrógeno amoniacal porque los aminoácidos se incorporaban directamente a la proteína microbiana, pudiendo derivar el 66% del N incorporado a los microorganismos directamente de péptidos y aminoácidos.

Como se dijo anteriormente, las bacterias celulolíticas no se benefician de los péptidos y aminoácidos preformados (Russell y col., 1992), pero si necesitan AGVR, procedentes de la fermentación de aminoácidos, para formar aminoácidos ramificados ya que no pueden formar sus esqueletos carbonados *de novo* (NRC, 1996). Por esta razón, la presencia de AGVR estimulará el crecimiento de las bacterias celulolíticas en dietas ricas en forraje (Russell y Sniffen, 1984) y la digestión de la fibra (Gorosito y col., 1985). Otras bacterias, como *Prevotella ruminicola*, tienen la capacidad de sintetizar aminoácidos *de novo* a partir de los carbonos de la glucosa, aunque si tienen acceso a los productos intermedios los utilizarán preferentemente a la síntesis *de novo* (Wallace y Cotta, 1988).

En resumen, aunque la mayoría de la proteína microbiana derive del amoniacal y algunas especies puedan incorporar péptidos y aminoácidos preformados, el crecimiento de toda la población ruminal es máximo cuando los aportes nitrogenados están formados por péptidos, aminoácidos y amoniacal (Hoover y Stokes, 1991).

### 5.3. Eficiencia de síntesis

La eficiencia de síntesis puede definirse como los gramos de MS bacteriana formados por cada ATP generado (Hespell y Bryant, 1979). Por la dificultad de medir los moles de ATP formados, la eficiencia de síntesis se ha referido a la cantidad de MO fermentada en el rumen (Van Soest, 1982) y algunos investigadores han sugerido expresar la eficiencia en función de los carbohidratos digeridos, ya que son los que más energía aportan (Hoover y Stokes, 1991).

La eficiencia de síntesis microbiana vendrá determinada por las fuentes de energía y nitrógeno disponibles en cantidad y tipo, como vimos anteriormente; por la sincronización entre la disponibilidad de energía y proteína; por condiciones ruminales como el pH y el ritmo de paso, que determinarán el reciclaje ruminal y las necesidades de mantenimiento de las bacterias, y finalmente por el tipo de marcadores utilizados para estimar la fracción microbiana y el flujo duodenal (Firkins, 1996). Hespell y Bryant (1979) consideran una eficiencia de síntesis microbiana máxima de 46,7 g N

microbiano / kg MO fermentada y los sistemas de alimentación proponen unos valores medios inferiores: el ARC (1984) propone un valor de 32 g N/ kg MO aparentemente fermentada; el INRA (1988) estima la eficiencia de síntesis microbiana a través de una regresión múltiple de las 3 fracciones de nitrógeno no amoniacal que llegan a duodeno (dietario, microbiano y endógeno) y propone un valor de  $23 \pm 6,3$  g N/ kg MO fermentada; y el NRC (1996) propone un valor de 20,8 g N/ kg de TDN, para dietas con más de 20% de FND.

### 5.3.1. Sincronía entre energía y proteína

La sincronización entre la energía y la proteína degradable es un factor importante en la optimización de la síntesis de proteína microbiana (Herrera-Saldana y col., 1990). La falta de sincronización puede aumentar las necesidades de mantenimiento de los microorganismos, ya que el ATP formado no puede incorporarse a los procesos anabólicos y se deriva a otras actividades no relacionadas con el crecimiento, como puede ser la síntesis de polisacáridos (Russell, 1998), que a su vez disminuirán la eficiencia de síntesis (Hespell y Bryant, 1979). En dietas con nitrógeno rápidamente disponible y fuentes de energía de fermentación lenta, habrá un exceso de nitrógeno que no será incorporado a la síntesis microbiana y que será absorbido a través de la pared ruminal o expulsado hacia el abomaso, disminuyendo la eficiencia de utilización de la proteína degradable para la síntesis microbiana. En dietas con energía rápidamente disponible puede haber problemas de sincronización si no se dispone de fuentes de nitrógeno rápidamente degradables.

*In vivo* es más difícil observar efectos negativos de la desincronización, ya que los aportes de nitrógeno endógeno pueden modularse y compensar el déficit de nitrógeno dietario para la síntesis de proteína microbiana. Por otra parte, la alimentación cruzada entre bacterias también puede paliar la falta de nitrógeno y otros nutrientes en un periodo de restricción durante el ciclo alimentario (Firkins, 1996). El NRC (1996) aprovecha la disponibilidad de nitrógeno endógeno para considerar una eficiencia de utilización de los productos de degradación proteica para la síntesis microbiana del 100%, es decir asume una utilización óptima del nitrógeno degradado como en el caso de una perfecta sincronización entre las fuentes de energía y proteína. Sin embargo, el INRA (1988) y AFRC (1993) consideran una eficiencia del 80 y el 90 %, respectivamente.

### 5.3.2. Dietas concentradas

Demeyer y Van Nevel (1986) en un sistema de cultivo continuo observaron un aumento en la eficiencia de síntesis de 40,6 a 54,5 g N microbiano/ kg MO fermentada al sustituir celulosa pura por almidón de maíz. Concluyeron que las poblaciones celulolíticas eran menos eficientes que las amilolíticas, posiblemente porque el proceso de degradación de la fibra es más lento y supone un mayor gasto energético. Sin embargo, esto no se ha podido observar en experimentos *in vivo*; Spicer y col. (1986) en dietas ricas en grano obtuvieron una eficiencia de síntesis microbiana más baja (17 g N/ kg TDN) que el valor medio propuesto por el NRC (1996), y Owens y Goetsch (1986), a través de unas ecuaciones de predicción de la eficiencia de síntesis a partir de la ingestión de forraje y concentrado, también observaron una eficiencia de síntesis un 50% menor en dietas de todo concentrado respecto a dietas de todo forraje. Es más, el NRC (1996) tiene en cuenta esta disminución de la eficiencia de síntesis en dietas concentradas y la penaliza en sus ecuaciones de predicción. Siguiendo las recomendaciones de Russell y col. (1992), el NRC (1996) propone que la producción de proteína microbiana se reduce un 2,2% por cada 1% de descenso en el contenido de FND-e en raciones por debajo de un 20% de FND.

Esta disminución en la eficiencia de síntesis puede ser debida a varios fenómenos que se han explicado anteriormente que pueden darse en dietas concentradas. La acidificación del pH ruminal, frecuente en dietas concentradas, derivará parte de la energía formada al mantenimiento de la neutralidad del pH intracelular en contra del gradiente de protones (Strobel y Russell, 1986) y a la entrada de amoníaco por transporte activo (Russell y Strobel, 1987), en vez de destinarse al crecimiento microbiano.

Otra causa de reducción en la eficiencia de síntesis en dietas concentradas, no asociada a la acidificación del pH ruminal, puede deberse a la toxicidad del exceso de carbohidratos. Cuando no hay compuestos nitrogenados disponibles para la síntesis microbiana, la energía proveniente de la fermentación de los carbohidratos se destina a otros procesos no relacionados con el crecimiento, como la síntesis de polisacáridos intra o extracelulares, ya que el exceso de energía puede reducir la viabilidad celular (Russell, 1998). Una mala sincronización en dietas concentradas nos puede llevar a disipar energía en estos procesos y reducir la eficiencia de síntesis. En cambio, si en estas condiciones se dispone de fuentes proteicas degradables que proporcionen péptidos y aminoácidos, éstos serán incorporados directamente a la síntesis proteica,

aumentando considerablemente la eficiencia porque no se disipará energía en estos procesos no relacionados con el crecimiento y destinados a aumentar la viabilidad celular. El aumento de la eficiencia al incorporar péptidos y aminoácidos no se debe a una disminución en los gastos de biosíntesis, ya que prácticamente se igualan con el coste de transporte a través de la membrana, sino más bien a que no se pierde tanta energía en procesos no relacionados con el crecimiento (energy spilling) (Russell, 1998). Cecava y col. (1991) también observaron un descenso en la eficiencia de síntesis en dietas concentradas respecto a las forrajeras, pero remarcan que la incorporación de fuentes de proteína degradable, que aporten péptidos y aminoácidos, puede aumentar la eficiencia de síntesis en estas dietas.

El CNCPS tiene en cuenta esta estimulación de los péptidos sobre la eficiencia de síntesis microbiana de las bacterias amilolíticas (Russell y col., 1992), pero su error es que no tiene en cuenta la velocidad de fermentación de los carbohidratos, y el nitrógeno aminoacídico solamente estimula el crecimiento cuando los carbohidratos están en exceso y la fermentación es rápida (Van Kessel y Russell, 1996).

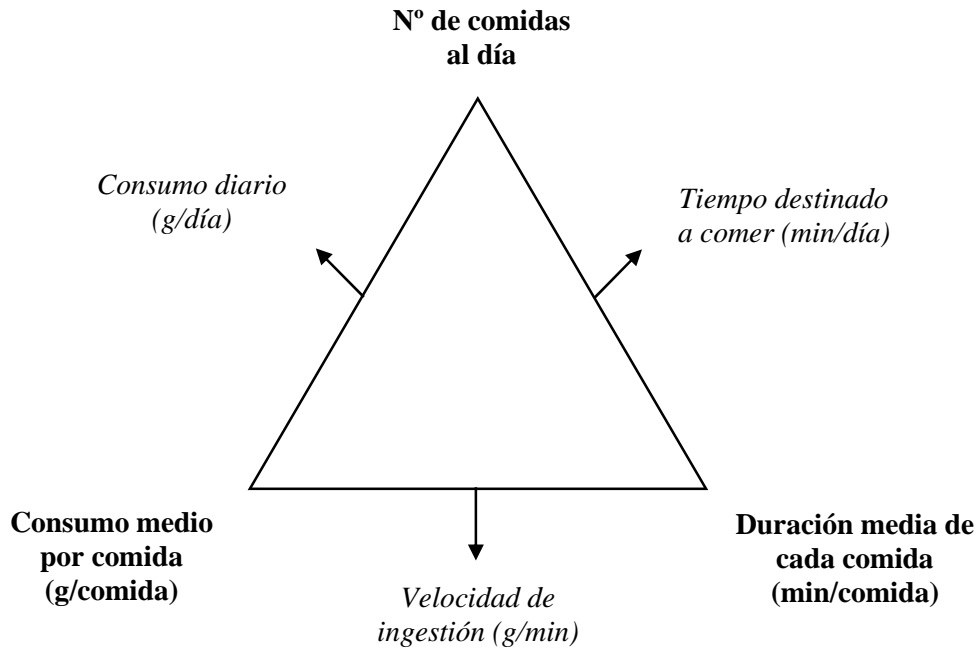
## 6. Comportamiento de ingestión

La dieta ha sido ampliamente considerada como el factor externo más determinante del tipo de fermentación ruminal. Sin embargo, no hay que olvidar que en última instancia la fermentación vendrá determinada por la manera en que el animal ingiera la dieta ofrecida, es decir, por el comportamiento de ingestión.

Los rumiantes, así como todos los animales domésticos, no comen continuamente durante todo el día, sino que dividen su ingestión diaria en un conjunto de comidas, de un determinado tamaño y duración, separadas por unos intervalos en que el animal no come (Nielsen, 1999). Estos factores definen el denominado comportamiento de ingestión a corto plazo (Figura 10). A nivel de nutrición y de fermentación ruminal, se trabaja con cantidades diarias ingeridas, muchas veces sin tener en cuenta que una misma cantidad se puede ingerir mediante diferentes combinaciones de frecuencia, tamaño y duración de las comidas, que podrán afectar a la fermentación.

Las características de la dieta, como la presentación, la composición y la palatabilidad, el estado fisiológico del animal, así como su condición social, van a afectar al comportamiento de ingestión (Albright, 1993). Por eso es más difícil *in vivo* predecir la fermentación ruminal a partir de las características de una dieta, ya que será

el animal quien, en última instancia, decida que cantidad, en que momento y en que grado de insalivación llegue al rumen para ser fermentada.



**Figura 10.** Componentes del comportamiento de ingestión y sus interacciones. Las medidas de los vértices son las primarias, y las derivadas localizadas en los lados del triángulo se pueden calcular a partir de las dos medidas primarias que conectan (Adaptado de Nielsen, 1999).

## 7. Objetivos y planteamiento experimental

La especificidad del sistema de producción de carne de vacuno en España, caracterizado por el uso de dietas altas en concentrado desde el destete, aunque éste se haya realizado a corta edad, hasta el sacrificio, hace que muchos aspectos de la ingestión, la fermentación ruminal y la degradación de nutrientes, ampliamente estudiados en otras condiciones ruminales, sean desconocidos en condiciones derivadas de esta alimentación.

En Europa, la inclusión de leguminosas grano en los piensos ha cobrado interés en los últimos años, con el inconveniente de que estos suplementos están relativamente poco caracterizados por los principales sistemas de alimentación disponibles para el vacuno de carne (AFRC, 1993; IRNA, 1988; NRC, 1996). Igualmente, los valores de degradación proteica propuestos por estos sistemas han sido estimados en animales adultos alimentados con una dieta más forrajera que la usada en nuestros cebaderos. Estos valores no son aplicables a la formulación de dietas para terneros en cebo intensivo, por un efecto del nivel de concentrado de la dieta sobre la degradación proteica y por la poca información disponible de como varía la velocidad y el grado de degradación con el crecimiento del animal.

Por otra parte, la cebada y el maíz son los cereales más utilizados en dietas concentradas y aunque tienen diferentes velocidades de degradación ruminal del almidón, se han realizado pocos esfuerzos para sincronizar su degradación con fuentes proteicas y así maximizar la eficiencia de la fermentación ruminal. De la misma forma, hay poca información sobre como los terneros pueden modular la ingestión y la masticación de estas dietas tan fermentativas para evitar problemas ruminales y metabólicos.

En el marco de esta problemática en la alimentación de terneros con dietas concentradas, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Estudio de la degradabilidad proteica de suplementos vegetales, incluyendo algunas leguminosas. Efecto del nivel de fibra de la dieta y de la edad sobre la fermentación ruminal y, en concreto, sobre la degradación proteica.
2. Estudio de la sincronización de la degradabilidad ruminal entre fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína, y del efecto que pueda tener sobre la ingestión y el comportamiento de ingestión, y sobre la fermentación ruminal.

Para el estudio de la degradabilidad proteica, se diseñaron dos dietas altas en concentrado, isoenergéticas e isoproteicas pero con distinto nivel de fibra y se



administraron a 6 terneras desde los 80 hasta los 250 kg de peso vivo. Mediante un diseño de medidas repetidas se estudió el efecto del nivel de fibra de la ración y de la edad sobre la fermentación ruminal y sobre la degradación de la proteína de dos leguminosas grano y de 2 subproductos vegetales incubados *in situ* (**Experimento 1, artículo 1**). Posteriormente, las mismas dietas fueron asignadas a 4 terneras de 300 kg en un diseño cross-over (**Experimento 2, artículo 2**) para estudiar en la última fase de engorde, el efecto del nivel de fibra de la ración sobre la fermentación ruminal y sobre la degradación *in situ* de 7 suplementos proteicos vegetales, incluyendo 5 leguminosas grano de creciente interés para la alimentación de terneros en cebo intensivo.

Para el estudio de la sincronización de la degradabilidad ruminal entre fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína, se diseñaron 4 dietas altas en concentrado, isoenergéticas e isoproteicas combinando dos fuentes de carbohidratos (cebada y maíz) y dos fuentes de proteína (harina de soja y harina de girasol). Cebada y harina de girasol se mezclaron para sincronizar una fermentación rápida, maíz y harina de soja para sincronizar una fermentación lenta, y las otras dos combinaciones (cebada-soja; maíz-girasol) se incluyeron como dietas desincronizadas. Mediante un diseño de cuadrado latino, con 4 terneras de 132 kg al inicio del experimento, se estudió el efecto de estas combinaciones sobre la ingestión, la digestibilidad aparente de todo el tracto, el metabolismo ruminal y el comportamiento de ingestión (**Experimento 3**). Estas mismas dietas se utilizaron *in vitro* en el **experimento 4**, con 8 fermentadores de doble flujo continuo para caracterizar la fermentación ruminal y la síntesis de proteína microbiana con dos niveles de pH: constante a 6,2, o fluctuante, 12 h a 5,8 y 12 h a 6,4, simulando condiciones de acidosis subclínica frecuentemente asociadas a estas dietas. Los resultados del experimento 4 se presentan conjuntamente con los resultados de metabolismo del experimento 3 en el **artículo 3** y los resultados de comportamiento de ingestión en el **artículo 4**.

## 8. Citas bibliográficas

- Abe, M., T. Iriki, N. Tobe, y H. Shibui. 1981. Sequestration of Holotrich protozoa in the reticulo-rumen of cattle. *Appl. Env. Microbiol.* 41:758-765.
- AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. Agric. Food Res. Council Tech. Comm. on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Albright, J. L. 1993. Feeding behavior of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76:485-498.
- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462.
- Anderson, K. L., T. G. Nagaraja, y J. L. Morril. 1987a. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.* 70:1000-1005.
- Anderson, K. L., T. G. Nagaraja, J. L. Morril, T. B. Avery, S. J. Galitzer, y J. E. Boyer. 1987b. Ruminal microbial development in conventionally or early-weaned calves. *J. Anim. Sci.* 64:1215-1226.
- ARC. 1984. The nutrient requirements of ruminant livestock. Suppl. No. 1. Commonwealth Agricultural Bureaux, London, UK.
- Balasini, D. 1972. El ternero. Cría y explotación. Ed. Mundi Prensa. Madrid.
- Balch, C. C. 1971. Proposal to use time spent chewing as an index to extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristics of roughages. *Br. J. Nutr.* 36:383-392.
- Balch, C. C., y V. W. Johnson. 1950. Factors affecting the utilization of food by dairy cows. 2. Factors influencing the rate of breakdown of cellulose (cotton thread) in the rumen of the cow. *Br. J. Nutr.* 4:389-395.
- Baldwin, R. L., y B. W. Jesse. 1992. Developmental changes in glucose and butyrate metabolism by isolated sheep ruminal cells. *J. Nutr.* 122:1149-1153.
- Baldwin, R. L., K. R. McLeod, J. L. Klotz, y R. N. Heitmann. 2004. Rumen development, intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *J. Dairy Sci.* 87:(E. Suppl.):E55-E65.
- Bartley, E. E. 1973. Effects of a self-fed pelleted mixture of hay and calf starter on the performance of young dairy calves. *J. Dairy Sci.* 56:817-820.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, N. R. Merchen, y G. C. Fahey. 1994a. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: I. Site and extent of organic matter, nitrogen, and cell wall digestion. *J. Anim. Sci.* 72:746-758.

- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, J. Van Milgen, y G. C. Fahey. 1994b. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: II. Ruminal digestion kinetics of cell wall components. *J. Anim. Sci.* 72:759-767.
- Brockman, R. P. 1993. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. Pág. 249-265 en: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. J. M. Forbes, J. France, Eds. CAB International. Wallingford. Oxon, UK.
- Broderick, G. A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *Br. J. Nutr.* 58:463-475.
- Broderick, G. A. 1994. Quantifying forage protein quality. Pág. 200 en: *Forage quality, evaluation, and utilization*. G. C. Fahey, Jr., Ed. Am. Soc. Agroc., Madison, W.I.
- Broderick, G. A., y R. J. Wallace. 1988. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids and fluorescamine-reactive peptides in the sheep rumen. *J. Anim. Sci.* 66:2233-2238.
- Bryant, M. P., e I. M. Robinson. 1963. Apparent incorporation of ammonia and amino acid carbon during growth of selected species of ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* 46:226-234.
- Bryant, M. P., y N. Small. 1960. Observations of the ruminal microorganisms of isolated and inoculated calves. *J. Dairy Sci.* 43:654-667.
- Bryant, M. P., N. Small, C. Bouma, e I. Robinson. 1958. Studies on the composition of the ruminal flora and fauna of young calves. *J. Dairy Sci.* 41:1747-1767.
- Burroughs, W., P. Gerlaugh, B. H. Edgington, y R. M. Bethke. 1949. The influence of corn starch upon roughage digestion in cattle. *J. Anim. Sci.* 36:218-226.
- Bush, R. S. 1988. Effect of age and diet on in vitro metabolism in rumen epithelium from Holstein calves. *Can. J. Anim. Sci.* 68:1245-1251.
- Calsamiglia, S., I. K. Yoon, y M. D. Stern. 1994. Effect of various incubation times on in situ estimation of ruminal crude protein degradation. *J. Anim. Sci.* 72(Suppl. 1):171 Abstract.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., y M. Devant. 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Cecava, M. J., N. R. Merchen, L. L. Berger, R. I. Mackie, and G. C. Fahey, Jr. 1991. Effects of dietary energy level and protein source on nutrient digestion and ruminal nitrogen metabolism in steers. *J. Anim. Sci.* 69:2230-2243.

- Chalmers, M. I., y R. L. M. Syngé. 1954. The digestion of protein and nitrogenous compounds in ruminants. *Adv. Prot. Chem.* 9:93-120.
- Chalupa, W., J. Clark, P. Opliger, y R. Lavker. 1970. Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. *J. Nutr.* 100:161-169.
- Chen, G., J. B. Russell, y C. J. Sniffen. 1987. A procedure for measuring peptides in rumen fluid and evidence that peptide uptake can be a rate limiting step in ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.* 70:1211-1219.
- Cheng, K. J., y J. W. Costerton. 1980. Adherent rumen bacteria: their role in the digestion of plant material, urea and epithelial cells. Pág. 227-250 en: *Digestive physiology metabolism in ruminants*. Y. Ruckebusch, y P. Thivend, Eds. MTP Press, Lyncaster.
- Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato, y J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Pág. 595-623 en: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, y R. Kawashima, Eds. Academic Press. London.
- Chesson, A., y C. W. Forsberg. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pág. 251-284 en: *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, Ed. Elsevier, NY.
- Cotta, M. A., y R. B. Hespell. 1986. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. Pág. 121-136 en: *Control of digestion and metabolism in ruminants*. L. P. Milligan, W. L. Grovum, y A. Dobson, Eds. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Cotta, M. A., y J. B. Russell. 1982. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 65:226-234.
- Coverdale, J. A., H. D. Tyler, J. D. Quigley, y J. A. Brumm. 2004. Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. *J. Dairy Sci.* 87:2554-2562.
- Czerkawski, J. W., y G. Breckenridge. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 38:371-389.
- Czerkawski, J. W., y G. Breckenridge. 1982. Distribution and changes in urease (EC 3.5.1.5) activity in rumen simulation technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 47:331-348.
- De Veth, M. J., y E. S. Kolver. 2001. Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:2066-2072.

- Dehority, B. A., y C. G. Orpin. 1988. Development of and natural fluctuations in, ruminal microbial populations. Pág. 151-183 en: *The rumen microbial ecosystem*, P. N. Hobson, Ed. Elsevier Applied Sciences, London, UK.
- Demeyer, D. I., y C. J. Van Nevel. 1986. Influence of substrate and microbial interactions on efficiency of rumen microbial growth. *Reprod., Nutr., Develop.* 26:161-179.
- Devant, M., A. Ferret, J. Gasa, S. Calsamiglia, y R. Casals. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667-1676.
- Dhanao, M. S., J. France, S. López, J. Dijkstra, S. J. Lister, D. R. Davies, y A. Bannink. 1999. Correcting the calculation of extent of degradation to account for particulate matter loss at zero time when applying the polyester bag method. *J. Anim. Sci.* 77:3385-3391.
- Eliman, M. E., y E. R. Ørskov. 1984. Factors affecting the outflow of protein supplements from the rumen. *Anim Prod.* 38:45-51.
- Eliman, M. E., y E. R. Ørskov. 1985. Factors affecting the outflow of protein supplements from the rumen. 3. Effects of feeding intake or water inducted by the addition of sodium chloride and the particle size of protein supplements. *Anim. Prod.* 40:309-313.
- El-Shazly, K., B. A. Dehority, y R. R. Johnson. 1961. Effects of starch on the digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganism. *J. Anim. Sci.* 20:268-273.
- Erfle, J. D., F. D. Sauer, y S. Mahadevan. 1977. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 60:1064-1072.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Theather, S. Mahadevan, y F. D. Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1514.
- Fahey, G. C., y L. L. Berger. 1988. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. Pág. 305-338 en: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.* 126:1347S-1354S.

- Firkins, J. L. 1997. Effects of feeding nonforage fiber sources on site of fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 80:1426-1437.
- Fondevilla, M., y B. A. Dehority. 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in co-culture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.* 77:541-548.
- Fonty, G., y K. N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: Their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. Pág. 655-679 en: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, y R. Kawashima, Eds. Academic Press, Inc. San Diego, CA.
- Forsberg, C. W., L. A. Lovelock, L. Krumholz, y J. G. Buchanan-Smith. 1984. Protease activities of rumen protozoa. *Appl. Env. Microbiol.* 121:105-119.
- France, J., y R. C. Siddons. 1993. Volatile fatty acids production. Pág. 107-121 en: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. J. M. Forbes y J. France, Eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Fuchigami, M., T. Senshu, y M. Horiguchi. 1989. A simple continuous culture system for rumen microbial digestion study and effects of defaunation and dilution rates. *J. Dairy Sci.* 73:3070-3078.
- Funaba, M., K. Kagiya, T. Iriki, y M. Abe. 1994. Changes in nitrogen balance with age in calves weaned at 5 or 6 weeks of age. *J. Anim. Sci.* 72:732-738.
- Gálfi, P., T. Veresegyházy, S. Neogrády, y F. Kutas. 1981. Effect of sodium n-butyrate on primary ruminal epithelial cell culture. *Zender. Vet. Med.* 28:259-261.
- Ganev, G., E. R. Ørskov, y R. Smart. 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *J. Agric. Sci. Camb.* 93:651-656.
- Goering, H. K., y P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). *Agric. Handbook No. 379*. ARS, USDA, Washington, DC.
- Gorosito, A. R., J. B. Russell, y P. J. Van Soest. 1985. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on digestion of plant cell. *J. Dairy Sci.* 68:840-847.
- Grant, R. J. 1997. Interaction among forage and non forage fiber sources. *J. Dairy Sci.* 80:1438-1446.
- Haskins, B. R., M. B. Wise, H. B. Craig, T. N. Blumer, y E. R. Barrick. 1969. Effects of adding low levels of roughage substitutes to high energy rations for fattening steers. *J. Anim. Sci.* 29:345-352.

- Hegarty, M. P., y P. J. Peterson. 1973. Free amino acids, amines and ureides. Pág. 2-62 en: Chemistry and biochemistry of herbage. G. W. Butler y R. W. Bailey, Eds. Academic Press, London and New York.
- Herrera-Saldana, R., R. Gomez-Alarcon, M. Torabi, y J. T. Huber. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142-148.
- Hespell, R. B., y M. P. Bryant. 1979. Efficiency of rumen microbial growth: influence of some theoretical and experimental factors on  $^Y$ ATP. *J. Anim. Sci.* 49:1640-1659.
- Hino, T., y J. B. Russell. 1985. Effect of reducing-equivalent disposal and NADH/NAD on deamination of amino acids by intact rumen microorganisms and their cell extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:168-1374.
- Ho, Y. W., N. Abdullah, y S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134:177-181.
- Hodgson, J. 1971a. The development of solid food intake in calves. 1. The effect of previous experience of solid food, and the physical form of the diet, on the development of food intake after weaning. *Anim. Prod.* 13:15-24.
- Hodgson, J. 1971b. The development of solid food intake in calves. 2. Studies on the volume of ruminal fluid, determined by an indirect method. *Anim. Prod.* 13:25-36.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755-2766.
- Hoover, W. H., y S. R. Strokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74: 3630-3644.
- Hoover, W. H., B. A. Crooker, y C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen content. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Hristov, A., y G. A. Broderick. 1994. In vitro determination of ruminal protein degradability using [ $^{15}$ N]-ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *J. Anim. Sci.* 72:1344-1354.
- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York.
- Huntington, J. A., y D. I. Givens. 1995. The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. *Nutrition abstracts and reviews (series B)* 65:63-93.

- Hvelplund, T., y M. R. Weisbjerg. 2000. In situ techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. Pág. 233-258 en: Forage evaluation in ruminant nutrition. CAB International Publishing, Wallingford. Oxon. UK.
- IFCN Beef Report 2003. IFCN/FAL, Braunschweig.
- INRA, 1988. Alimentation des bovins, ovins et caprins. INRA Editions, Paris.
- Itsasse, L., R. I. Smart, y R. E. Ørskov. 1986. Comparison between two methods of feeding concentrate to sheep given a diet high or low in concentrate, with or without buffering substances. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16:37-49.
- Kane, E. A., W. C. Jacobson, y P. M. Damewood, Jr. 1959. Effect of corn starch on digestibility of alfalfa hay. *J. Dairy Sci.* 42:849-854.
- Kang-Meznarich, J. H., y G. A. Broderick. 1981. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. *J. Anim. Sci.* 51:422-431.
- Kennedy, P. M. 1985. Influences of cold exposure on digestion of organic matter, rates of passage of digesta in the gastrointestinal tract, and feeding and rumination behaviour in sheep given four forage diets in the chopped or ground and pelleted form. *Br. J. Nutr.* 53:159-173.
- Klein, R. D., R. L. Kincaid, A. S. Hodgson, J. H. Harrison, J. K. Hillers, y J. D. Cronrath. 1987. Dietary fiber and early weaning on growth and rumen development of calves. *J. Dairy Sci.* 70:2095-2104.
- Kleiner, D., y E. Fitzke. 1979. Evidence of ammonia translocation by *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96:211-217.
- Krajcarski-Hunt, H., J. C. Plaizier, J. P. Walton, R. Spratt, y B. W. McBrite. 2001. Short communication: Effect of subacute ruminal acidosis on in situ fiber digestion in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:570-573.
- Lallès, J. P., y C. Poncet. 1990. Changes in ruminal and intestinal digestion during and after weaning in dairy calves fed concentrate diets containing pea or soya bean meal. Digestion of organic matter and nitrogen. *Livest. Prod. Sci.* 24:129-142.
- Lane, M. A., y B. W. Jesse. 1997. Effect of volatile fatty acid infusion on development of the rumen epithelium in neonatal sheep. *J. Dairy Sci.* 80:740-746.
- Lane, M. A., R. L. Baldwin, y B. W. Jesse. 2000. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. *J. Anim. Sci.* 78:1990-1996.



- Lane, M. A., R. L. Baldwin, y B. W. Jesse. 2002. Developmental changes in ketogenic enzyme gene expression during sheep rumen development. *J. Anim. Sci.* 80:1538-1544.
- Leng, R. A. 1982. Dynamics of protozoa in the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* 48:399-415.
- Libro Blanco de la agricultura y del desarrollo rural. 2003. Cap. 12. Vacuno de carne. MAPA.
- Lindberg, J. L. 1981. The effect of basal diet on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. *Swedish J. agric. Res.* 11:159-169.
- Lindberg, J. E. 1985. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the in sacco technique and various in vitro methods: A review. *Acta Agric. Scy. Suppl.* 25:64-97.
- Loerch, S. C., L. L. Berger, D. Gianola, y G. C. Fahey, Jr. 1983. Effects of dietary protein source and energy level on in situ nitrogen disappearance of various protein sources. *J. Anim. Sci.* 56:206-216.
- López, S., J. France, J. Dijkstra, y M. S. France. 1999. Comparison of mathematical models to describe disappearance curves obtained using the polyester bag technique for incubating feeds in the rumen. *J. Anim. Sci.* 77:1875-1888.
- Lyford, J. L. 1988. Crecimiento y desarrollo del aparato digestivo de los rumiantes. Pág. 47-68 en: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.
- Mackie, R. I., F. M. C. Gilchrist, A. M. Robberts, P. E. Hannah, y H. M. Schwartz. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *J. Agric. Sci. Camb.* 90:241-250.
- Madsen, J., y T. Hvelplund. 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a european ringtest. *Livest. Prod. Sci.* 39:201-212.
- Mahadevan, S., J. D. Erfle, y F. D. Sauer. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 50:723-728.
- Mahadevan, S., F. D. Sauer, y J. D. Erfle. 1987. Preparation of protease from mixed rumen microorganisms and its use for the in vitro determination of the degradability of true protein in feedstuffs. *Can. J. Anim. Sci.* 67:55-64.
- MAPA. 2001. Estadísticas Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En: [www.mapya.es/es/ganaderia/pags/hechosycifras](http://www.mapya.es/es/ganaderia/pags/hechosycifras).

- MAPA. 2002. Estadísticas Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. En: [www.mapya.es/es/ganaderia/pags/hechosycifras](http://www.mapya.es/es/ganaderia/pags/hechosycifras).
- MAPA. 2004. Estadísticas Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. En: [www.mapya.es/es/ganaderia/pags/hechosycifras](http://www.mapya.es/es/ganaderia/pags/hechosycifras).
- Mathers, J. C., y E. L. Miller. 1981. Quantitative studies of food protein degradation and the energetic efficiency of microbial protein synthesis in the rumen of sheep given chopped lucerne and rolled barley. *Br. J. Nutr.* 45:587-604.
- McAllister, T. A., R. C. Phillipe, L. M. Rode, y K. J. Cheng. 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71:205-212.
- Mehrez, A. Z., E. R. Ørskov, e I. McDonald. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
- Mertens, D. R. 1985. Effect of fiber on feed quality for dairy cows. Pág. 209 en: *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Minnesota Nutrition Conference*. St. Paul, MN.
- Mertens, D. R., y J. R. Loften. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. *J. Dairy Sci.* 63:1437-1446.
- Michalet-Doreau, B., y M. Y. Ould-Bah. 1992. In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40:57-86.
- Michalet-Doreau, B., R. Vérité, y P. Chapoutot. 1987. Méthodologie de mesure de la dégradabilité in sacco de l'azote des aliments dans le rumen. *Bull. Tech., Cent. Rech. Zootech. Vet. Theix, INRA* 69:5-7.
- Minato, H., M. Otsuka, S. Shirasaka, H. Itabashi, y M. Mitsumori. 1992. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 38:447-456.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type mechanism. *Nature, London* 191:144-148.
- Molero, R., M. Ibars, S. Calsamiglia, A. Ferret, y R. Losa 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114: 91-104.
- Mould, F. L., E. R. Ørskov, y S. O. Mann 1983/84a. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid

- pH on cellulolysis in in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
- Mould, F. L., E. R. Ørskov, y S. A. Gauld. 1983/84b. Associative effects of mixed feeds. II. The effect of dietary addition of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:31-47.
- Murdock, F. R., y R. W. Wallenius. 1980. Fiber sources for complete calf starter rations. *J. Dairy Sci.* 63:1869-1873.
- Nielsen, B. L. 1999. On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constrain. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 63:79-91.
- Nikolić, A., y R. Filipovic. 1981. Degradation of maize protein in rumen contents. Influence of ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 45:111-116.
- Nocek, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J. Anim. Sci.* 60:1347-1358.
- Nocek, J. E. 1988. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J. Dairy Sci.* 71:2051-2069.
- Nocek, J. E., y J. B. Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070-2107.
- Nocek, J. E., y S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- Nocek, J. E., J. H. Herbein, y C. E. Polan. 1980. Influence of ration physical form, ruminal degradable nitrogen and age on rumen epithelial propionate and acetate transport and some enzymatic activities. *J. Nutr.* 110:2355-2364.
- Nocek, J. E., C. W. Heald, y C. E. Polan. 1984. Influence of ration physical form and nitrogen availability on ruminal morphology of growing bull calves. *J. Dairy Sci.* 67:334-343.
- Nolan, J. V. 1993. Nitrogen kinetics. Pág. 123-145 en: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. J. M. Forbes y J. France, Eds. CAB International. Wallingford. Oxon. UK.
- NRC. 1985. *Ruminal nitrogen usage*. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC. 1989. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 6th ed. Academy Press, Washington, DC.

- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- NRC. 2001. Requirements of dairy cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Olaisen, V., T. Mejdell, H. Volden, y N. Nesse. 2003. Simplified in situ method for estimating ruminal dry matter and protein degradability of concentrates. *J. Anim. Sci.* 81:520-528.
- Olubobokun, J. A., W. M. Craig, y K. R. Pond. 1990. Effects of mastication and microbial contamination on ruminal in situ forage disappearance. *J. Anim. Sci.* 68:3371-3381.
- Orpin, C. G. 1979. Chemotaxis in rumen ciliate protozoa. *Proc. Soc. Gen. Microbiol.* 7:32-36.
- Orpin, C. G. 1981. Isolation of cellulolytic phycomycete fungi from the caecum of the horse. *J. Gen. Microbiol.* 123:287-296.
- Orpin, C. G., y L. Bountiff. 1978. Zoospore chemotaxis in the rumen phycomycete *Neocallimastix frontalis*. *J. Gen. Microbiol.* 104:113-122.
- Ørskov, E. R. 1992. Protein nutrition in ruminants. Academic Press Limited. 24-28 Oval Road, London NW1 7DX, UK.
- Ørskov, E. R., y C. Fraser. 1975. The effects of processing of barley-based supplements on rumen pH, rate of digestion, and voluntary intake of dry grass in sheep. *Br. J. Nutr.* 34:493-500.
- Ørskov, E. R., e I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499-503.
- Ørskov, R. E., y N. A. McLeod. 1982. The flow of nitrogen from the rumen of cows and steers maintained by intraruminal infusion of volatile fatty acids. *Proc. Nutr. Society*, 41:76A.
- Ørskov, E. R., y M. Ryle. 1998. Energy nutrition in ruminants. Chalcombe Publications, Painshall, Church Lane, Welton, Lincoln, LN2 3LT, UK.
- Ørskov, E. R., D. Benzie, y R. N. B. Kay. 1970. The effects of feeding procedure on closure of the oesophageal groove in young sheep. *Br. J. Nutr.* 24:785-795.
- Owens, F. N., y A. L. Goetsch. 1986. Digesta passage and microbial protein synthesis. Pág. 196-226 en: Control of digestion and metabolism in ruminants. L. P. Milligan,

- W. L. Grovum y A. Dobson, Eds. Reston Book, Prentice-Hall, Englamood Cliffs, New Jersey.
- Owens, F. N., y R. Zinn. 1988. Metabolismo de la proteína en los rumiantes. Pág. 255-282 en: El rumiante, fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.
- Payne, J. W. 1983. Peptide transport in bacteria: Methods, mutants and energy coupling. *Biochem. Soc. Trans.* 11:794-798.
- Pereira, M. N., y L. E. Armentano. 2000. Partial replacement of forage with nonforage fiber sources in lactating cow diets. II. Digestion and rumen function. *J. Dairy Sci.* 83:2876-2887.
- Pitt, R. E., J. S. Van Kessel, D. G. Fox, A. N. Pell, M. C. Barry, y P. J. Van Soest. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *J. Anim. Sci.* 74:226-244.
- Poe, S. E., D. G. Ely, G. E. Mitchell, W. P. Deweese, y H. A. Glimp. 1971. Rumen development in lambs. I. Microbial digestion of starch and cellulose. *J. Anim. Sci.* 32:740-743.
- Poppi, D. P., W. B. Norton, D. J. Minson, y R. E. Hendricksen. 1980. The validity of critical size theory for particles leaving the rumen. *J. Agric. Sci.* 94:275-280.
- Preston, T. R., F. G. Whitelaw, y N. A. MacLeod. 1963. Ruminal ammonia formation from soluble and insoluble protein sources. *Anim. Prod.* 5:147-156.
- Quigley, J. D., C. G. Schwab, y W. E. Hylton. 1985. Development of rumen function in calves: Nature of protein reaching the abomasum. *J. Dairy Sci.* 68: 694-702.
- Quigley, J. D., L. A. Caldwell, G. D. Sinks, y R. N. Heitmann. 1991. Changes in blood glucose, nonesterified fatty acids, and ketones in response to weaning and feed intake in young calves. *J. Dairy Sci.* 74:250-257.
- Quin, J. I., J. C. Van der Wath, y S. Mybrugh. 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. IV. Description of experimental technique. Onderstepoort. *J. Vet. Sci. Animal Ind.* 11:341.
- Roy, J. H. B. 1980. The digestive system of the calf. Pág. 201-219 en: The calf. Forth edition, J. H. B. Roy, Ed. Butterworths.
- Russell, J. B. 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 49:572-579.
- Russell, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* 73:363-370.

- Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- Russell, J. B., y D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Env. Microbiol.* 39:604-610.
- Russell, J. B., y C. J. Sniffen. 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria in vitro. *J. Dairy Sci.* 67:987-994.
- Russell, J. B., y H. J. Strobel. 1987. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 70:970-976.
- Russell, J. B., y D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79:1503-1509.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, y P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66: 763-775.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, y C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3551-3561.
- Sadik, M. S., J. T. Huber, K. King, R. Wanderley, D. DeYoung, A. Al-Dehneh, y C. Dudas. 1990. Comparison of nitrogen-15 and diaminopimelic acid for estimating bacterial protein synthesis of lactating cows fed diets of varying protein degradability. *J. Dairy Sci.* 73:694-702.
- Sakata, T., K. Kitosaka, Y. Shiomura, y H. Tamate. 1980. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. *Br. J. Nutr.* 44:325-331.
- Sander, E. G., R. G. Warner, H. N. Harrison, y J. K. Loosli. 1959. The stimulatory effect of sodium butyrate and sodium propionate on the development of rumen mucosa in the young calf. *J. Dairy Sci.* 42:1600-1605.
- Satter, L. D., y L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., y W. V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Slater, A. L., M. L. Eastridge, J. L. Frinkings, y L. J. Bidinger. 2000. Effects of starch source and level of forage neutral detergent fiber on performance by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:313-321.

- Slyter, L. L., L. D. Satter, y D. A. Dinius. 1979. Effect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. *J. Anim. Sci.* 48:906-912.
- Smith, L. W., y R. D. Waldo. 1969. Method for sizing forage cell wall particles. *J. Dairy Sci.* 52:2051.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, y J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and Protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577.
- Soita, H. W., D. A. Christensen, y J. J. Mckinnon. 2000. Influence of particle size on the effectiveness of fiber in barley silage. *J. Dairy Sci* 83:2295-2300.
- Spicer, L. A., C. B Theurer, J. Sowe, y T. H. Noon. 1986. Ruminal and postruminal utilization of nitrogen and starch from sorghum grain-, corn- and barley-based diets by beef steers. *J. Anim. Sci.* 62:521-530.
- Stern, M. D., y W. H. Hoover. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *J. Anim. Sci.* 46:1590-1603.
- Stern, M., A. Bach, y S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* 75:2256-2276.
- Strobel, H. J., y J. B. Russell. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69:2941-2947.
- Sutton, J. D., McGilliard, y N. L. Jacobson. 1963. Functional development of rumen mucosa. I. Absorptive ability. *J. Dairy Sci.* 46:426-436.
- Swain, S. M., y L. E. Armentano. 1994. Quantitative evaluation of fiber from nonforage sources used to replace alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 77:2318-2331.
- Tamate, H., A. D. McGuilliard, N. L. Jacobson, y R. Getty. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *J. Dairy Sci.* 45:408-419.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.* 49:1615-1630.
- Teather, R. M., y F. D. Sauer. 1988. A naturally compartmented rumen simulation system for the continuous culture of rumen bacteria and protozoa. *J. Dairy Sci.* 71:666-673.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, y A. B. McAllan. 1991. A new laboratory procedure for estimating kinetic parameters associated with the

- digestibility of forages. En: Proc. Int. Symp. on Forage Cell Wall Structure and Digestibility, USDA-ARS, Wisconsin.
- Tilley, J. M. A., y R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-109.
- Vadiveloo, J., y W. Holmes. 1979. The effects of forage digestibility and concentrate supplementation on the nutritive value of the diet and performance of finishing cattle. *Anim. Prod.* 29:121-129.
- Van Kessel, J. S., y J. B. Russel. 1996. The effect of amino nitrogen on energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. *J. Dairy Sci.* 79:1237-1243.
- Van Soest, P. J. 1982. Nutritional ecology of the ruminant animal. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fibre, neutral fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3588-3597.
- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, E. C. Tigmeyer, S. D. Stafford, K. C. Olson, D. E. Johnson, y G. St. Jean. 1996. In vivo and in situ measurements of forage protein degradation in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 74:2773-2784.
- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, y E. C. Tigmeyer. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuffs evaluation. *J. Anim. Sci.* 76:2717-2729.
- Varga, G. A., y E. S. Kolver. 1997. Microbial and animal limitations to fiber digestion and utilisation. Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilisation by ruminants. *J. Nutr.* 127:819S-823S.
- Varga, G. A., H. M. Dann, y V. A. Ishler. 1998. The use of fiber concentration for ration formulation. *J. Dairy Sci.* 81:3063-3074.
- Varvikko, T., y J. E. Lindberg. 1985. Estimation of microbial nitrogen in nylon bags residues by feed 15N dilution. *Br. J. Nutr.* 54:473-481.
- Veira, D. M. 1986. The role of ciliate protozoa in nutrition of the ruminant. *J. Anim. Sci.* 63:1547-1560.
- Wales, W. J., E. S. Kolver, P. L. Thorne, y A. R. Egan. 2004. Diurnal variation in ruminal pH on the digestibility of highly digestible perennial ryegrass during continuous culture fermentation. *J. Dairy Sci.* 87:1864-1871.
- Wallace, R. J. 1991. Rumen proteolysis and its control. Pág. 131-150 en: Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. J. P. Jouany, Ed. INRA editions, Paris.



- Wallace, R. J., y M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pág. 217-250 en: *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, Ed. Elsevier Applied Science, NY.
- Wallace, R. J., y J. Kopêcný. 1983. Breakdown of diazotized proteins and synthetic substrates by rumen bacterial proteases. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:212-217.
- Wallace, R. J., y C. A. McPherson. 1987. Factors affecting the rate of break down of bacterial protein in the rumen fluid. *Br. J. Nutr.* 58:313-323.
- Wanderley, R. C., J. T. Huber, Z. Wu, M. Pessarakli, y C. Fontes, Jr. 1993. Influence of microbial colonization of feed particles on determination of nitrogen degradability by in situ incubations. *J. Anim. Sci.* 71:3073-3077.
- Wardrop, J. D. 1961. Some preliminary observations on the histological development on the forestomach of the lamb. I. Histological changes due to age in the period from 46 days of foetal life to 77 days of posnatal life. *J. Agric. Sci.* 57:335-341.
- Warner, A. C. I. 1981. Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. *Nutr. Abs. Rev.* 51:789-820.
- Warner, R. G. 1991. Nutritional factors affecting the development of a functional ruminant: A historical perspective. *Proc. Cornell. Nutr. Conf.* 1-12, Ithaca, NY.
- Warner, R. G., W. P. Flatt, y J. K. Loosli. 1956. Dietary factors influencing the development of the ruminant stomach. *J. Agric. Food Chem.* 4:788-792.
- Warren, W. P., F. A. Martz, K. M. Asay, E. S. Hilderbrand, C. G. Payne, J. R. Vogt. 1974. Digestibility and rate of passage by steers fed tall fescue, alfalfa and orchardgrass hay in 18 and 32°C ambient temperature. *J. Anim. Sci.* 39:93-96.
- Watson, R. H. 1944. Studies on diglutitions in sheep. I. Observations on the course taken by liquids through the stomach at various ages from birth to maturity. *Comun. of Aust. Coun. for Sci. and Indus. Research. Bull.* 180:1-94.
- Weakley, D. C., M. D. Stern, y L. D. Satter. 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. *J. Anim. Sci.* 56:493-507.
- Wester, J. 1930. The rumination reflex in the ox. *The Vet. J. London* 86:401-410.
- Wilkerson, V. A., T. J. Klopfenstein, y W. W. Stroup. 1995. A collaborative study of in situ forage protein degradation. *J. Anim. Sci.* 73:583-588.
- William, P. P., y W. E. Dinusson. 1972. Composition of the ruminal flora and establishment of ruminal ciliated protozoal species in isolated calves. *J. Anim. Sci.* 34:469-474.

- 
- Woods, V. B., F. P. O'Mara, y A. P. Moloney. 2002. The in situ ruminal degradability of concentrate feedstuffs in steers as affected by level of feed consumption and ratio of grass silage to concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 100:15-30.
- Yokohama, M. T., y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. Pág. 137-158 en: *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición*. C. D. Church, Ed. Editorial Acribial. Zaragoza, España.

## **CAPÍTULO 2: TRABAJOS EXPERIMENTALES**

### **ARTÍCULO 1**

**Cambios en la fermentación ruminal y en la degradación proteica en terneras Holstein en crecimiento entre los 80 y los 250 kg alimentadas con dietas concentradas con distinta proporción de forraje y concentrado**

**Changes in ruminal fermentation and protein degradation in growing Holstein heifers from 80 to 250 kg fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio.****Abstract**

Six Holstein heifers (initial BW  $65.2 \pm 1.8$  kg) fitted with ruminal cannulas were used in a repeated measures trial to assess the effect of age and forage to concentrate ratio on ruminal fermentation end products and *in situ* degradation kinetics of four plant protein supplements (soybean meal, sunflower meal, peas, and lupin seeds). Alfalfa hay was also incubated *in situ* to estimate NDF degradation. Three experimental periods were conducted at 13, 27, and 41 wk of age. Heifers were fed one of two diets, 12:88 vs. 30:70 forage to concentrate ratio (DM basis), offered as total mixed ration on an ad libitum basis. Intake of DM, OM, CP and NDF, and ADG were not affected ( $P \geq 0.105$ ) by diet. The 30:70 diet resulted in faster ( $P = 0.045$ ) liquid passage rate and decreased ( $P = 0.015$ ) ammonia N concentration than the 12:88 diet, but no differences ( $P \geq 0.244$ ) were detected in ruminal pH and total VFA concentration between diets. The rate of degradation and the effective degradability of N in protein supplements was greater with the 30:70 diet for peas ( $P \leq 0.008$ ) and lupin seeds ( $P \leq 0.02$ ), and in the 12:88 diet for sunflower meal ( $P \leq 0.06$ ). Degradation of NDF of alfalfa hay was low with both diets (18.5 and 23.7 % for 12:88 and 30:70, respectively). However, rate and extent of degradation of DM and NDF were greater ( $P \leq 0.016$ ) with the 30:70 diet, suggesting a higher cellulolytic activity. Total VFA concentration and the proportion of propionate increased ( $P \leq 0.035$ ) and the acetate proportion decreased ( $P = 0.021$ ) with age. Average pH, ammonia N concentration and passage rates were not affected ( $P \geq 0.168$ ) by age. Degradation rate and effective degradability of N of sunflower meal, peas, lupin seeds and of DM of alfalfa hay increased ( $P \leq 0.08$ ) with age, but degradation kinetics of NDF of alfalfa hay was not affected ( $P \geq 0.249$ ). The increase in rate and extent of N degradation with age would suggest an increase in proteolytic activity, and the changes in the fermentation pattern may reflect an increase in amylolytic activity caused mainly by an increase in the gross intake of nonstructural carbohydrates and by adaptation of ruminal microflora after long exposure to these nutrients.

**Key Words:** Growing Cattle, Protein Degradation, Ruminal Fermentation

## 1. Introduction

Feeding systems available for beef cattle (INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 1996) use protein degradation values mostly estimated *in situ* and obtained in adult animals fed diets with a higher forage to concentrate ratio than that commonly used in intensive beef production systems. Recent reviews of *in situ* procedures for estimating protein degradability have emphasized that the diet fed to cannulated animals, especially the forage to concentrate ratio, alters estimations of the rate and extent of protein degradation (Huntington and Givens, 1995; Vanzant et al., 1998; Broderick and Cochran, 2000). Moreover, protein degradability values estimated in mature calves are not applicable to young weaned calves because of an effect of age and rumen development on rumen degradability (Lallès and Poncet, 1990; Vazquez-Añón et al., 1993). Evidence of this rumen development is the increase of microbial protein reaching the duodenum with age (Quigley et al., 1985; Devant et al., 2000). Devant et al. (2000) also observed changes in fermentation profile and DM degradation of straw in heifers fed high concentrate diets from 100 to 230 kg BW, indicating that changes continue to occur long after weaning. It is likely that these changes also affect protein degradation in the rumen, but information on how the rate and extent of degradation vary as ruminants grow is very limited.

The objective of this study was to describe the changes in ruminal fermentation and protein degradation of plant protein supplements in growing Holstein heifers from 80 to 250 kg BW fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratios.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals, diets, and housing

Six female Holstein calves (6 wk of age,  $54.9 \pm 1.4$  kg BW) from a commercial farm were used in this repeated measures trial. Calves were reared for 3 wk at the experimental farm and the rearing program consisted of 250 g/d of milk replacer (22.5% CP and 19% fat) in a 10% DM solution fed once daily. A commercial calf starter (17.8% CP and 11.3% NDF; DM basis) and barley straw were available from birth on an ad libitum basis. At 8 wk of age ( $65.2 \pm 1.8$  kg BW), heifers were fitted with a ruminal cannula (3.5 cm i.d., Bar Diamond, Parma, ID). At 19 wk of age, ruminal cannulas were replaced with larger ones (7.5 cm i.d., Bar Diamond, Parma, ID) because of the increase in the diameter of the fistula and the thickness of the abdominal wall.

The research protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

One week after surgery, animals were weaned and randomly assigned to one of two experimental diets (Table 1). Diets were isoenergetic (2.75 Mcal/kg DM of ME) and isonitrogenous (15.1% CP; DM basis) and formulated to meet requirements for animals growing at 0.9 kg/d (NRC, 1996). Diets were designed to differ in the forage to concentrate ratio (12:88 vs. 30:70), the NDF content (21.6% vs. 27.9%; DM basis), and the source of forage NDF (barley straw vs. dehydrated alfalfa).

**Table 1.** Ingredient and chemical composition of diets

Item	Diet <sup>a</sup>	
	12:88	30:70
Ingredient composition, % of DM		
Corn, ground	34.35	24.50
Barley, ground	34.35	24.50
Soybean meal, 44% CP	11.80	4.90
Cane molasses	5.20	3.96
Barley straw	11.80	--
Soybean hulls	--	10.10
Dehydrated alfalfa, 17% CP	--	30.10
White salt	0.40	0.36
Dicalcium phosphate	0.60	0.36
Sodium bicarbonate	0.40	0.36
Calcium carbonate	0.80	0.56
Vitamin/mineral premix <sup>b</sup>	0.30	0.30
Chemical composition, % DM		
DM, %	86.91	87.21
OM	93.02	92.61
CP	15.26	15.01
EE <sup>c</sup>	1.84	2.28
NDF	21.85	27.90
ADF	9.72	16.90
ADL	0.81	2.39
NFC <sup>d</sup>	54.07	47.42

<sup>a</sup>Diets: 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>Vitamin and mineral premix contained per kg DM: 3,300 kIU vitamin A, 660 kIU vitamin D<sub>3</sub>, 2,100 IU vitamin E, 0.66 g thiamin, 0.66 g riboflavin, 2.2 mg vitamin B<sub>12</sub>, 26 mg choline chloride, 13.4 g Zn, 3.3 g Fe, 83.3 g S, 16.6 g Mn, 16.6 g Mg, 3.3 g Cu, 116.6 mg I, 166.6 mg Co, 66.6 mg Se, 100 mg ethoxyquin, 100 mg butylated hydroxytoluene.

<sup>c</sup>EE: ether extract content.

<sup>d</sup>NFC: non-fiber carbohydrates calculated as 100 - (CP + ash + NDF + EE).

Mean lengths of barley straw and dehydrated alfalfa were 4.1 and 2.8 cm, respectively. Subsequently, diets will be referred to as 12:88 and 30:70. Because dehydrated alfalfa is rich in protein, soybean hulls were also included in the 30:70 diet in order to keep protein content at 15%. Diets were offered once daily (0800) as total mixed ration. Heifers were housed individually in outdoor paved and covered pens (2.0 m × 1.4 m) equipped with individual feed bunks and with ad libitum access to feed and water.

## 2.2. Sample collection and analyses

The experiment consisted of three 17-d periods, conducted every 14 wk. Body weight was recorded before feeding on three consecutive days at the start and at the end of the trial to calculate overall ADG, and on d 1 of each experimental period to measure BW at each age. Refusals were weighed before feeding and the offered ration was 115% of the previous day's intake. From d 1 to 7, feed and refusal samples were collected and composited for each heifer in order to calculate nutrient intake.

Four plant protein supplements were incubated *in situ* from d 8 to 14 to estimate effective ruminal degradability (ED) of N. Protein supplements were solvent-extracted soybean meal (SBM: 49.1% CP, 12.1% NDF; DM basis), solvent-extracted sunflower meal (SFM: 33.8% CP, 37.8% NDF; DM basis), peas (23.0% CP, 8.3% NDF; DM basis), and lupin seeds (34.4% CP, 23.9% NDF; DM basis). Samples were ground through a 3-mm screen (Hammer mill, P. Prats S.A., Sabadell, Spain). Alfalfa hay (19.8% CP, 29.9% NDF; DM basis) was also incubated at the same time to estimate ruminal degradation of DM and NDF. Plant protein sources (1.5 g, except 1 g for SBM; as-fed basis) and alfalfa hay (2 g; as-fed basis) were weighed into 5 × 10 cm nylon bags made from N free polyester (Ankom Technology Co., Fairport, NY) with a mean pore size of 50 ± 15 µm and heat sealed (Dea Lun Co., Ltd, Taiwan). Protein supplements were incubated for 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, and 72 h, whereas alfalfa hay was incubated for 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, and 96 h. Bags were placed at the same time and removed sequentially. One empty bag for each hour and diet was included and used as a blank in N analysis. This sequence was repeated twice within each period, and the two sequences were treated as replications for statistical analyses. Bags were removed and washed with cold water in a washing machine (3 cycles of 5 min), and dried at 103°C in a forced air oven for 24 h. Alfalfa hay residues were dried at 60°C over 72 h. Before ruminal incubation, bags were soaked in warm water for 30 min. Washing losses (time 0) were

estimated by soaking the bags for 30 min in warm water and then washed as the incubated bags. Bag residues of protein supplements were analyzed for DM and N, and alfalfa hay residues for DM and NDF.

On d 15, 30 min before the morning feeding, heifers were dosed intraruminally with chromium mordanted SBM (22.5 g/kg DMI, representing 1.2 g Cr/kg DMI) and CoEDTA (1 g/kg DMI) in a 50-mL aqueous solution (Udén et al., 1980) in order to estimate ruminal solid and liquid passage rates. A sample of 500 mL of ruminal contents was collected with a vacuum pump from different locations in the rumen before the morning feeding and at 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, and 24 h postfeeding, and squeezed through two layers of cheesecloth. After sampling, extra ruminal contents were returned to the rumen. The pH of the ruminal fluid was measured immediately and three subsamples were taken. First, a 4-mL subsample of strained fluid was acidified with 4-mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were later thawed in the refrigerator (12 h at 4°C), then centrifuged at  $25,000 \times g$  for 20 min, and the supernatant fraction was analyzed for  $\text{NH}_3\text{N}$  by spectrophotometry (Chaney and Marbach, 1962). Second, based on the method of Jouany (1982), 1 mL of a solution made up of 0.2% (wt/wt) mercuric chloride (to impede microbial growth), 2% (vol/vol) orthophosphoric acid, and 0.2% (wt/wt) 4-methylvaleric (internal standard) in distilled water was added to 4 mL of strained ruminal fluid, and the mixture was frozen. Volatile fatty acids were analyzed with a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., UK) by gas chromatography using the G1530A (6890) model of the Hewlett Packard gas chromatograph (Hewlett Packard GmbH Chemische Analysentechnik, Waldbronn, Germany). Third, a 30-mL sample of strained ruminal fluid was frozen and stored. Samples were later centrifuged at  $25,000 \times g$  for 20 min before being analyzed for Co concentration by atomic absorption spectrophotometry (Udén et al., 1980). Samples at 0.5 and 1 h postfeeding were only used for Co determination.

For Cr analysis, ruminal solid samples were collected from d 15 to 17 before the morning feeding and at 4 and 12 h postfeeding. Samples were dried at 103°C over 48 h and Cr concentration was determined according to the procedure of Le Du and Penning (1982) by atomic absorption spectrophotometry. Before marker administration, a sample of ruminal contents was collected to determine the background concentrations of Co and Cr.

Feeds, refusals, and supplements were analyzed for DM (24 h at 103°C) and ash (4 h at 550°C). Nitrogen content was determined using the Kjeldahl procedure (AOAC,



1990), ether extract was analyzed according to AOAC methods (1990), and NDF according to Van Soest et al. (1991) using sodium sulfite and alpha amylase.

### 2.3. Calculations

Ruminal fluid pH, NH<sub>3</sub> N, and VFA measures postfeeding were averaged across time by calculating the area under the ruminal data vs. time curve and dividing by total time (Pitt and Pell, 1997). Ruminal fluid and solid passage rates (kp) were calculated as the slope of the regression line of the natural logarithm of Co or Cr concentration vs. time, respectively (Faichney, 1975). Coefficients of determination (R<sup>2</sup>) for ruminal passage rates averaged 0.94 for Co and 0.89 for Cr. Values for ruminal disappearance of N and NDF vs. time were fitted to the exponential equation of Ørskov and McDonald (1979) and Dhanoa (1988), respectively. Effective degradation was calculated using the equation:  $ED = a + [(b \times c)/(c + kp)]$ , where a, b, c, and kp are the soluble fraction, insoluble but potentially degradable fraction, rate of degradation, and rate of passage, respectively. Coefficients a, b, and c were obtained from the exponential equations of the NLIN procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), and kp was obtained from the external marker used to estimate ruminal solid passage rate.

### 2.4. Statistical Analyses

Data were analyzed using PROC MIXED (Littell et al., 1996) of SAS for repeated measures. The model contained the effect of diet, period, and their interaction as fixed effects. Animal was used as random effect, and period was the repeated factor. For the ruminal data collected at different times after feeding, the period x time after feeding interaction was the repeated factor. The period represented the heifers' age in weeks.

The restricted maximum likelihood method was used to estimate the variance components and the Satterthwaite method was used to approximate the degrees of freedom. For each analyzed variable, data were subjected to four covariance structures: variance components, compound symmetric, one-band unstructured, and autoregressive of order one. The covariance structure that yielded the smaller Akaike and Schwarz's Bayesian criterion based on their -2 Res Log Likelihood was considered to be the most desirable for analysis. Standard errors presented in tables correspond to the maximum SE of the diet and period with the lowest number of observations. Regression analysis was conducted using the REG procedure of SAS, and the CORR procedure was used to

determine the correlation between variables. Effects were considered significant at  $P \leq 0.05$ .

### 3. Results and discussion

Average daily gain (0.9 kg/d) did not differ between dietary treatments and was close to the ADG predicted by NRC (1996). Mean BW of heifers across diets was  $86.5 \pm 3.7$ ,  $163.4 \pm 17.6$ , and  $258.5 \pm 25.7$  kg at 13, 27, and 41 wk of age, respectively. There were no statistically significant interactions between age and diet for any variable; therefore, main effects are presented and discussed separately.

#### 3.1. Diet effect

Intake of DM, OM, CP, and NDF, expressed as kg/d or as  $\text{g/BW}^{0.75}$ , did not differ statistically between diets (Table 2). Thus, the difference in forage to concentrate ratio was not enough to make the difference in NDF intake statistically significant. In spite of the differences in ingredient composition, the two diets resulted in similar intake and growth rate.

**Table 2.** Effects of diet and age on intake and NDF content of refusals

Item	Diet <sup>a,c</sup>				Age <sup>b,c</sup>				
	12:88	30:70	SE	P-value	13	27	41	SE	P-value
Observations, n	9	9			6	6	6		
Intake, kg/d									
DM	5.10	4.79	0.46	0.648	2.84	4.99	7.01	0.75	0.001
OM	4.83	4.45	0.42	0.537	2.63	4.78	6.50	0.68	0.001
CP	0.83	0.65	0.09	0.105	0.41	0.75	1.07	0.08	0.001
NDF	1.16	1.35	0.12	0.323	0.75	1.22	1.79	0.22	0.001
Intake, $\text{g/BW}^{0.75}$									
DM	109.8	101.2	5.96	0.317	99.9	107.5	109.2	9.0	0.623
OM	104.1	93.9	5.55	0.209	92.6	103.1	101.3	7.4	0.604
CP	16.8	15.2	0.87	0.212	14.9	16.4	16.7	1.4	0.479
NDF	23.8	27.3	1.67	0.164	22.7	26.0	27.9	3.4	0.142
NDF in refusals, %DM	23.3	30.0	1.93	0.031	33.9	27.5	18.5	2.9	0.001

<sup>a</sup>Diets: 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>Age of heifers in weeks.

<sup>c</sup>No diet x age interactions ( $P > 0.10$ ) were observed.

Mean, lowest, and highest ruminal pH were not different between diets and averaged  $6.37 \pm 0.13$ ,  $5.69 \pm 0.18$ ,  $7.45 \pm 0.11$ , respectively (Table 3). No differences were detected for postprandial pH evolution (Figure 1a). Despite the high levels of concentrate, no clinical signs of acidosis were observed in any animal. These results agree with Devant et al. (2000, 2001), who recorded similar pH data with heifers fed high concentrate diets. Beauchemin et al. (2003) observed that when steers were changed from a high forage to a high concentrate diet, the risk of acidosis decreased as time progressed. Therefore, it is likely that animals receiving the same high concentrate diet from weaning were probably adapted to the high concentrate intake and the risk of acidosis was minimized.

Total VFA concentration (average of  $122.0 \pm 8.18$  mM) and postprandial evolution (Figure 1b) were not affected by diet, nor were the molar proportions of propionate, butyrate, and valerate. In contrast, the molar proportion of acetate tended to increase ( $P = 0.098$ ) and branch chained VFA (BCVFA) tended to decrease ( $P = 0.093$ ) in the 30:70 diet compared with the 12:88 diet (Table 3).

Ruminal  $\text{NH}_3\text{N}$  concentration was higher ( $P = 0.015$ ) in the 12:88 diet (Table 3), but average concentration in both diets was above the level suggested to maximize microbial protein synthesis (5 mg/100 mL; Satter and Slyter, 1974). A time after feeding x diet interaction was detected for postprandial evolution of  $\text{NH}_3\text{N}$ , as a result of greater diurnal fluctuation in  $\text{NH}_3\text{N}$  concentration for heifers consuming the 12:88 diet (Figure 1c;  $P = 0.003$ ). The rapid postprandial decrease in  $\text{NH}_3\text{N}$  in the 12:88 diet can be explained by a rapid incorporation of  $\text{NH}_3\text{N}$  into microbial protein due to a higher availability of energy from nonstructural carbohydrates immediately after feeding, as observed by Bourquin et al. (1994a).

Solid passage rate was not affected by diet (average of  $6.99 \pm 0.78$  %/h) and was similar to the results reported by Devant et al. (2001) in similar experimental conditions, but higher than the average reported by Owens and Goetsch (1986) for high concentrate diets. Fluid passage rate was higher ( $P = 0.045$ ) in the 30:70 diet and was similar to the averages reported by Owens and Goetsch (1986) for a high concentrate diet and high intake. This higher passage rate may be due to an increase in mastication and salivation caused by the higher forage content in the 30:70 diet than a physical constraint in ruminal volume (Cole et al., 1976). The higher liquid passage rate observed in the 30:70 diet could be responsible for the lower  $\text{NH}_3\text{N}$  concentration observed in this diet resulting from a greater escape of  $\text{NH}_3\text{N}$  to the abomasum (Varga and Prigge, 1982),

together with the lower protein intake noted with this diet ( $P = 0.11$ ). A negative correlation was observed between liquid passage rate and  $\text{NH}_3\text{ N}$  concentration ( $r = -0.52$ ,  $P < 0.05$ ).

**Table 3.** Effects of diet and age on ruminal fermentation

Item	Diet <sup>a,c</sup>				Age <sup>b,c</sup>				
	12:88	30:70	SE	<i>P</i> -value	13	27	41	SE	<i>P</i> -value
Observations, n	9	7			5 <sup>d</sup>	6	5 <sup>d</sup>		
Ruminal pH									
Average	6.32	6.41	0.13	0.607	6.50	6.24	6.36	0.20	0.563
Lowest	5.66	5.72	0.18	0.800	5.95	5.56	5.56	0.17	0.132
Highest	7.38	7.52	0.11	0.355	7.63	7.33	7.39	0.11	0.084
$\text{NH}_3\text{ N}$ , mg/100 mL	13.1	5.5	1.87	0.015	9.2	10.8	8.0	2.5	0.717
Total VFA, mM	115.2	128.8	8.18	0.244	97.9	128.5	139.7	10.7	0.035
BCVFA <sup>e</sup> , mM	2.97	2.29	0.28	0.093	3.42	2.46	2.02	0.33	0.035
VFA, mol/100 mol									
Acetate	54.0	59.1	2.04	0.098	62.9	54.4	52.3	2.96	0.021
Propionate	28.6	26.3	1.99	0.416	18.2	31.1	33.1	2.99	0.001
Butyrate	12.4	10.4	1.02	0.189	13.0	10.2	11.0	1.62	0.163
Isobutyrate	1.09	0.90	0.08	0.135	1.44	0.94	0.62	0.14	0.001
Valerate	1.86	2.20	0.24	0.310	2.04	2.08	1.97	0.32	0.972
Isovalerate	2.03	1.10	0.25	0.030	2.43	1.27	1.00	0.40	0.054
Acetate:Propionate	2.2	2.6	0.25	0.268	3.6	1.9	1.7	0.35	0.003
Passage rates, %/h									
Fluid	9.40	12.10	0.68	0.045	10.98	9.05	12.21	1.13	0.168
Solid	6.69	7.29	0.78	0.586	7.11	6.69	7.17	1.47	0.941

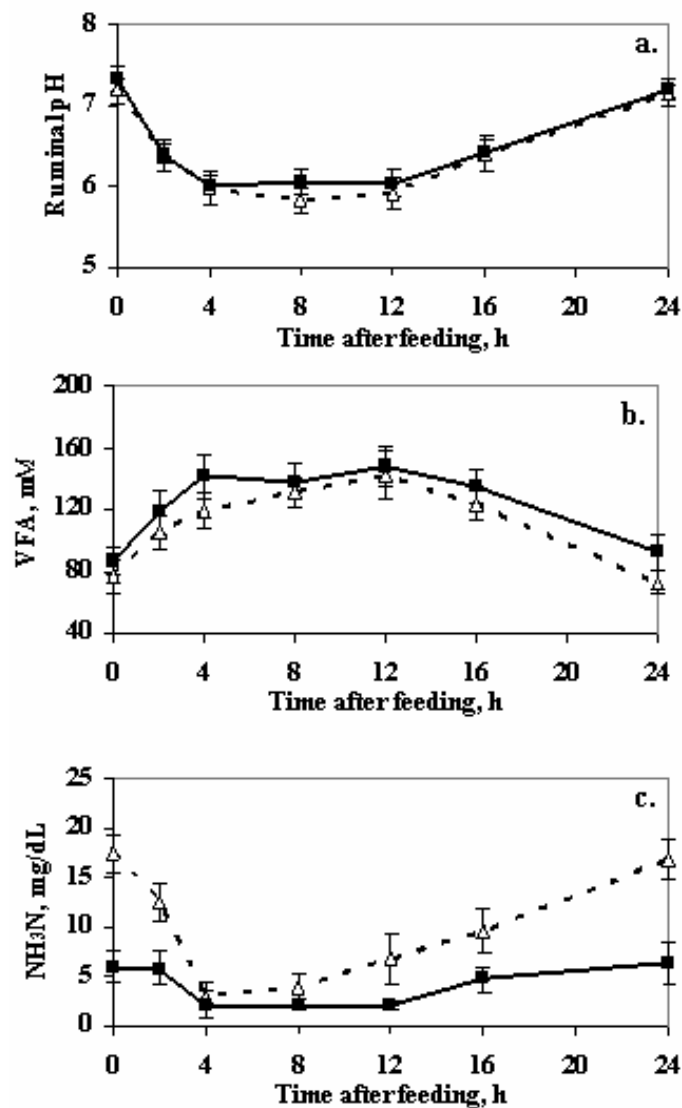
<sup>a</sup>Diets: 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>Age of heifers in weeks.

<sup>c</sup>No diet x age interactions ( $P > 0.10$ ) were observed.

<sup>d</sup>n = 5 at 13 and 41 wk due to missing ruminal data of one heifer.

<sup>e</sup>Branch chained VFA: Concentration of isobutyrate and isovalerate.



**Figure 1.** Ruminal pH (a), total VFA concentration (b), and concentration of ruminal NH<sub>3</sub> N (c) with time after feeding in 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio diets, represented as dotted line and solid line, respectively. Diet x time after feeding interactions were  $P = 0.902$  for pH;  $P = 0.744$  for total VFA concentration and  $P = 0.003$  for NH<sub>3</sub> N concentration.

Bourquin et al. (1994b) observed that dietary effects on *in situ* degradation were visible on the rate and extent of degradation but not on the soluble or potentially degradable fractions of the incubated feedstuff. In the present experiment, diet did not affect the soluble and potentially degradable fractions of N of plant protein supplements (Table 4), except for soluble fraction of SBM ( $P = 0.04$ ).

**Table 4.** Effects of diet and age on nitrogen degradation of plant protein supplements

Item	Diet <sup>a,c</sup>				Age <sup>b,c</sup>				
	12:88	30:70	SE	<i>P</i> -value	13	27	41	SE	<i>P</i> -value
Observations, n	18	18			12	12	12		
Soybean meal									
a <sup>d</sup> , %	16.9	15.2	0.46	0.040	16.7	15.9	15.7	0.89	0.135
b, %	82.8	84.1	1.64	0.591	84.6	84.6	81.0	3.35	0.603
c, %/h	7.5	7.0	0.65	0.513	6.3	7.1	8.3	0.84	0.217
ED, %	58.5	55.2	1.69	0.185	55.2	57.1	58.3	2.16	0.528
Sunflower meal									
a, %	28.6	27.9	0.54	0.324	28.4	28.2	28.2	0.86	0.965
b, %	65.1	65.0	0.60	0.981	65.5	65.6	64.1	1.08	0.443
c, %/h	24.5	20.4	1.38	0.061	18.7	23.9	24.6	2.15	0.041
ED, %	78.1	75.5	0.71	0.020	74.4	78.5	77.6	1.09	0.012
Peas									
a, %	39.1	39.1	0.47	0.971	38.2	39.3	39.8	0.73	0.248
b, %	60.8	60.9	0.49	0.949	61.8	60.5	60.2	0.73	0.239
c, %/h	6.4	8.3	0.42	0.008	5.5	7.9	8.5	0.56	0.006
ED, %	67.7	71.5	0.79	0.006	65.5	70.9	72.4	1.11	0.001
Lupins seeds									
a, %	29.8	28.7	0.68	0.266	28.9	29.1	29.8	1.01	0.681
b, %	70.2	71.5	0.83	0.307	71.3	71.8	69.4	1.35	0.146
c, %/h	6.6	8.2	0.30	0.001	6.2	7.3	8.6	0.40	0.001
ED, %	63.9	67.0	0.80	0.020	62.9	65.4	67.9	1.06	0.034

<sup>a</sup>Diets: 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>Age of heifers in weeks.

<sup>c</sup>No diet x age interactions ( $P > 0.10$ ) were observed, except for fraction a of soybean meal ( $P = 0.035$ ).

<sup>d</sup>a = soluble fraction; b = insoluble but potentially degradable fraction; c = rate of degradation; ED = effective degradability.

Rate of degradation of N was higher in the 30:70 diet for peas and lupin seeds ( $P \leq 0.008$ ), and tended to be higher in the 12:88 diet for SFM ( $P = 0.06$ ). Effective degradability of N was higher in the 30:70 diet for peas and lupin seed ( $P \leq 0.02$ ) and in the 12:88 diet for SFM ( $P = 0.02$ ) (Table 4).

Effective degradability of NDF of alfalfa hay was very low in both diets (Table 5) indicating a low cellulolytic activity. Because average pH was 6.37, the low cellulolytic activity can likely be attributed to a substrate effect rather than to pH inhibition (Mould and Ørskov, 1983). In both diets, pH was below 6 for less than 12 h a day, and this reduction in pH should not have seriously inhibited NDF degradation (Calsamiglia et al., 2002). Alfalfa hay had a greater rate and extent of DM ( $P = 0.016$  and  $P = 0.001$ , respectively) and NDF ( $P = 0.006$  and  $P = 0.014$ , respectively) degradation in the 30:70 diet vs. the 12:88 diet. This response cannot be attributed to a pH effect, as both diets had similar trends for ruminal pH, but rather to a greater cellulolytic fermentation (Hoover, 1986). A basal diet containing alfalfa could account for a more specific and efficient microflora adapted to the structure and composition of alfalfa cell wall, as Akin (1979) reported that the type of bacteria associated with fiber digestion varies among forages. This is supported by the trend of greater acetate proportion observed when this diet was fed.

**Table 5.** Effects of diet and age on DM and NDF degradation of alfalfa hay

Item	Diet <sup>a,c</sup>				Age <sup>b,c</sup>				
	12:88	30:70	SE	<i>P</i> -value	13	27	41	SE	<i>P</i> -value
Observations, n	18	18			12	12	12		
DM									
a <sup>d</sup> , %	39.7	43.8	0.87	0.002	39.4	42.7	43.3	1.19	0.026
b, %	37.6	31.5	1.36	0.016	38.4	34.1	31.2	2.42	0.027
c, %/h	4.8	7.5	0.63	0.016	5.0	6.9	6.4	1.07	0.085
Lag time, h	2.9	3.7	0.36	0.153	3.0	3.0	3.9	0.45	0.184
ED, %	54.4	59.2	0.88	0.001	54.3	58.6	57.5	1.17	0.021
NDF									
a, %	5.2	7.2	0.92	0.142	6.4	6.1	6.1	1.32	0.965
b, %	46.9	37.8	2.24	0.007	43.5	43.3	40.2	3.13	0.685
c, %/h	3.5	6.0	0.59	0.006	3.9	5.2	5.1	0.85	0.249
Lag time, h	3.6	3.6	0.38	0.885	3.8	3.2	3.8	0.53	0.572
ED, %	18.5	23.7	1.07	0.014	20.4	21.8	20.5	2.03	0.731

<sup>a</sup>Diets: 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

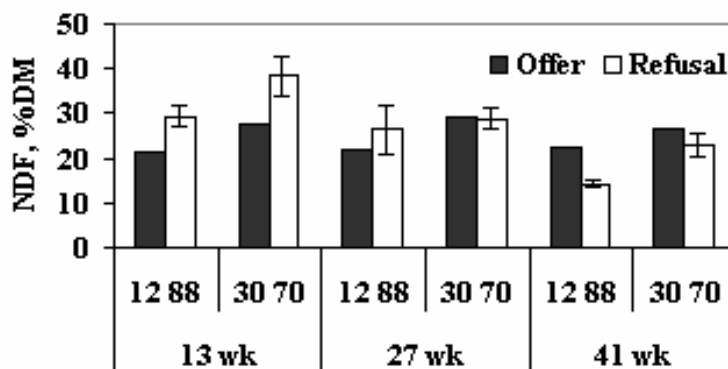
<sup>b</sup>Age of heifers in weeks; <sup>c</sup>No diet x age interactions ( $P > 0.10$ ) were observed.

<sup>d</sup>a = soluble fraction; b = insoluble but potentially degradable fraction; c = rate of degradation; ED = effective degradability.

As observed by Devant et al. (2000), mean values of nitrogen ED of protein supplements were lower than those reported in current beef feeding systems, probably because degradation values used by these systems have usually been obtained in animals fed a basal diet with a higher proportion of forage than that used in the present experiment. The reduced pH typically observed in high concentrate diets could also account for a decrease in proteolysis (Erflle et al., 1982; Shiver et al., 1986) and cellulolysis (Hoover, 1986). Ganev et al. (1979) observed that, as plant proteins are protected by a cellulose structure, protein degradation is greater in high forage diets because cellulolytic activity is greater in the ruminal conditions achieved with these diets, facilitating access to protein and, in consequence, its degradation. However, the low degradability of NDF of alfalfa hay and the small difference between diets were not enough to cause a clear effect of forage to concentrate ratio on protein degradation.

### 3.2. Age effect

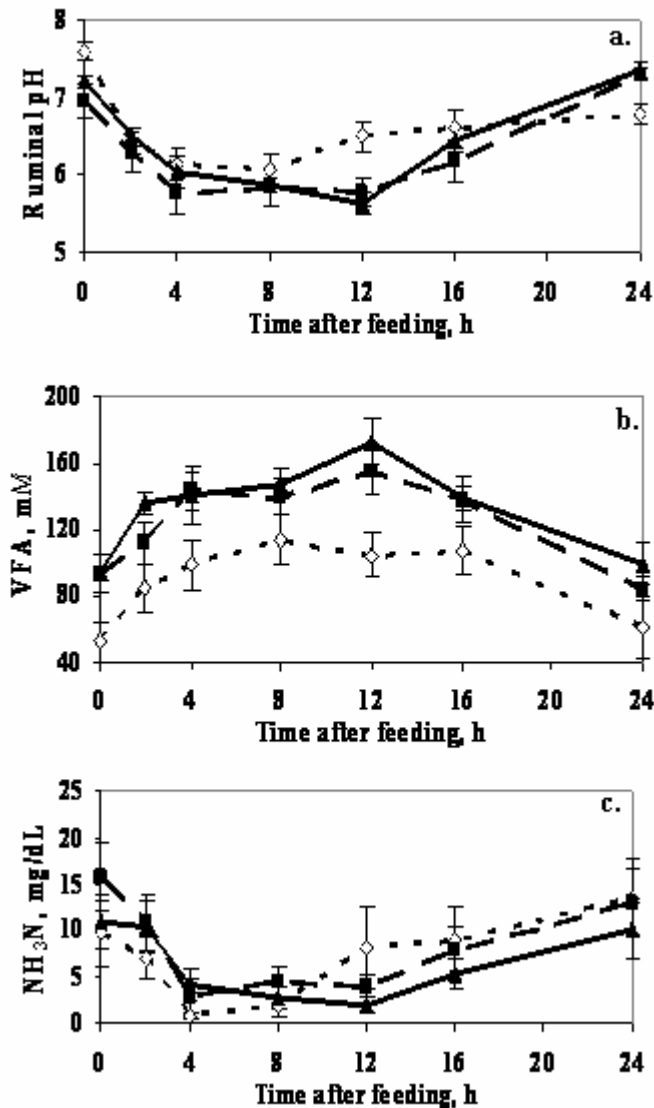
As expected intake of DM, OM, CP, and NDF, expressed as kg/d, increased (Table 2;  $P < 0.001$ ) with age. Intake of DM was strongly related to BW ( $DMI = 1.01 + 0.024 BW$ ;  $R^2 = 0.92$ ;  $P < 0.001$ ). In contrast, the effect of age disappeared when the intake was expressed as g/kg  $BW^{0.75}$ . Although the numerical increase in NDF intake was not significant, the NDF content of the refusals decreased (Table 2;  $P = 0.001$ ) with age in both diets (Figure 2), indicating that heifers selected against forage at 13 wk of age, were not selective at 27 wk and selected for forages at 41 wk. This may reflect an effect of BW on intake behavior and nutrient selection (Demment and Greenwood, 1988).



**Figure 2.** Effect of age (13, 27, and 41 wk) and diet (12:88 and 30:70, forage to concentrate ratio, DM basis) on NDF concentration in offer and refusals.



Mean ruminal pH was not affected by age, but there was a time after feeding x age effect on the postprandial evolution of pH (Figure 3a;  $P < 0.001$ ). At 13 wk of age, pH recovered to the prefeeding pH sooner after feeding and the lowest and highest pH values tended to be higher at this age (Table 3;  $P = 0.13$  and  $P = 0.08$ , respectively).



**Figure 3.** Ruminal pH (a), total VFA concentration (b), and concentration of ruminal NH<sub>3</sub> N (c) with time after feeding at 13, 27, and 41 wk of age, represented as dotted line, dashed line and solid line, respectively. Age x time after feeding interactions were  $P < 0.001$  for ruminal pH;  $P = 0.093$  for total VFA concentration and  $P = 0.405$  for ruminal NH<sub>3</sub> N concentration.

From wk 13 to 41, total VFA concentration increased ( $P = 0.035$ ), which is contrary to the results of Quigley et al. (1985), who observed that male Holstein calves weaned at 4 wk of age reached adult VFA concentration 2 wk after weaning. France and Siddons (1993) observed that rumen VFA concentration reflects the balance between the rate of production and the rate of removal. The majority of VFA produced are removed by absorption through the ruminal wall and a smaller proportion passes to the omasum. In the present experiment, ruminal conditions of pH did not seem to impair ruminal absorption of VFA, and the fluid passage rate did not vary with age, so the production rate may have increased. At each age, diurnal variation of total VFA concentration fluctuated concurrently with ruminal pH, peaking at the time in which pH started to increase and also exhibiting a time after feeding x age interaction (Figure 3b;  $P = 0.09$ ). Total VFA concentration accounted for 66.7% of the variance in ruminal pH ( $P < 0.001$ ). Molar proportion of acetate decreased ( $P = 0.02$ ) and propionate increased ( $P = 0.001$ ) with age, causing a decrease ( $P = 0.03$ ) in the acetate to propionate ratio from 3.6 to 1.7, at wk 13 and 41, respectively. The acetate:propionate:butyrate molar proportions changed from 63:18:13 at wk 13 to 52:33:11 at wk 41, indicating an increase in amylolytic fermentation related to cellulolytic fermentation. The VFA proportions observed at wk 41 agreed with the proportions observed by Rogers and Davis (1982) in cows fed a high concentrate diet. The acetate to propionate ratio at 13 wk of age (3.6) was higher than reported by other authors for weaned calves fed high concentrate diets (Anderson et al., 1987; Vazquez-Añón et al., 1993; Devant et al., 2000). This high acetate to propionate ratio at 13 wk could be due to a low propionate production caused by a high average and minimum pH (6.50 and 5.95, respectively). At this pH, cellulolytic bacterial populations have adequate conditions for growth, and propionate production is low (Sutton, 1981). With age, the increasingly high gross intake of nonstructural carbohydrates accounts for the change to an amylolytic pattern and the substantial increase in propionate production. The concentration of BCVFA also decreased with age (Table 3), probably due to a lower deamination of amino acids because the amylolytic bacteria prefer peptides and amino acids as a source of N (Russell et al., 1983). Proteolysis is not impaired but it stops before amino acid deamination. Ruminal  $\text{NH}_3$  N concentration was not affected by age and averaged  $9.3 \pm 2.5$  mg/100 mL (Table 3). Diurnal variation of  $\text{NH}_3$  N concentration followed the same trend as pH at each age but no time after feeding x age interaction was detected (Figure

3c). Passage rates of liquid and solid fraction were not affected by age, and averaged  $10.41 \pm 1.13$  and  $6.99 \pm 1.47$  %/h, respectively (Table 3).

The soluble and the insoluble but potentially degradable fractions of N of protein supplements were not affected by age (Table 4). The rate of degradation and the ED of N increased ( $P < 0.05$ ) with age in all supplements, except for SBM. On average, the ED of N was 7.7% greater at wk 41 than at wk 13. Dry matter ED of alfalfa hay also increased ( $P = 0.02$ ) with age, although NDF degradation was not affected. Using similar conditions, Devant et al. (2000) observed that degradability of barley straw increased with age, in correspondence with an increase in the acetate proportion in the rumen, although no effect on N degradability was observed.

The lack of effect of age on NDF degradation would confirm that the change in ruminal fermentation was towards a more amyolytic than cellulolytic activity, causing this low extent of NDF degradation observed in high-concentrate diets. Changes in ruminal fermentation end products observed from wk 13 to 41 suggest a higher amyolytic activity acquired with age, probably due to an increase in the gross intake of nonstructural carbohydrates and to an adaptation of rumen microflora to these nutrients. This higher amyolytic activity, not associated with low pH, could be the main factor responsible for the increase in the degradation rate and ED of N of plant protein supplements, because proteolytic rumen microorganisms tend to be amyolytic rather than cellulolytic (Siddons and Paradine, 1981).

In summary, when more forage was added to the basal diet, the effect on N effective degradability was supplement-dependent, increasing in peas and lupin seeds, decreasing in SFM and not changing in SBM. The present results suggest that in heifers from 80 to 250 kg BW fed high concentrate diets, ruminal fermentation becomes more proteolytic and amyolytic than cellulolytic, thereby decreasing the acetate to propionate ratio with age, and increasing the total ruminal VFA concentration and the *in situ* N effective degradability of plant protein supplements like SFM, peas and lupin seeds.

#### 4. Literature Cited

AFRC. 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. Agric. Food Res. Council Tech. Comm. on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

- Akin, D. E. 1979. Microscopic evaluation of forage digestion by rumen microorganisms. A review. *J. Anim. Sci.* 48:701-710.
- Anderson, K. L., T. G. Nagaraja, and J. L. Morril. 1987. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.* 70:1000-1005.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavi, G. R. Ghorbani, and W. Kautz. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:1628-1640.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, N. R. Merchen, and G. C. Fahey. 1994a. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: I. Site and extent of organic matter, nitrogen, and cell wall digestion. *J. Anim. Sci.* 72:746-758.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, J. Van Milgen, and G. C. Fahey. 1994b. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: II. Ruminal digestion kinetics of cell wall components. *J. Anim. Sci.* 72:759-767.
- Broderick, G. A., and R. C. Cochran. 2000. In vitro and in situ methods for estimating digestibility with reference to protein degradability. Pages 53-85 in *Feeding Systems and Feed Evaluation Models*. M. K. Theodorou and J. France, eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, and M. Devant. 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Cole, N. A., R. R. Johnson, F. N. Owens, and J. R. Males. 1976. Influence of roughage level and corn processing method on microbial protein synthesis by beef steers. *J. Anim. Sci.* 43:497-503.
- Demment, M. W., and G. B. Greenwood. 1988. Forage ingestion: Effects of sward characteristics and body size. *J. Anim. Sci.* 66:2380-2392.
- Devant, M., A. Ferret, J. Gasa, S. Calsamiglia, and R. Casals. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets, from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667-1676.

- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasà. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953.
- Dhanoa, M. S. 1988. On the analysis of dracon bag data for low degradability feeds (Research note). *Grass Forage Sci.* 43:441-444.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, and F. D. Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1514.
- Faichney, G. J. 1975. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. Pages 277-291 in *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. W. McDonald, and A. C. I. Warner, eds. University of New England Publishing Unit, Armidale, New South Wales, Australia.
- France, J., and R. C. Siddons. 1993. Volatile fatty acids production. Pages 107-121 in *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France, eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Ganev, G., E. R. Ørskov, and R. Smart. 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *J. Agric. Sci.* 93:651-656.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
- Huntington, J. A., and D. I. Givens. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. *Nutr. Abstr. Rev. (series B)* 65:63-93.
- INRA. 1988. *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. INRA Editions, Paris.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliment.* 2:131-144.
- Lallès, J. P., and C. Poncet. 1990. Changes in ruminal and intestinal digestion during and after weaning in dairy calves fed concentrate diets containing pea or soya bean meal. 1. Digestion of organic matter and nitrogen. *Livest. Prod. Sci.* 24:129-142.
- Le Du, Y. L. P., and P. D. Penning. 1982. Animal based techniques for estimating herbage intake. Pages 37-75 in *Herbage Intake Handbook*. J. D. Leaver, ed. Grassland Res. Inst., Hurley, UK.

- Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D. Wolfinger. 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Mould, F. L., and E. R. Ørskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- NRC. 1996. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499-503.
- Owens, F. N., and A. L. Goetsch. 1986. Digesta passage and microbial protein synthesis. Pages 196-223 in *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. L. P. Milligan, W. L. Grovum and A. Dobson, eds. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Pitt, R. E., and A. N. Pell. 1997. Modeling ruminal pH fluctuations: Interactions between meal frequency and digestion rate. *J. Dairy Sci.* 80:2429-2441.
- Quigley, J. D., III, C. G. Schwab, and W. E. Hylton. 1985. Development of rumen function in calves: Nature of protein reaching the abomasum. *J. Dairy Sci.* 68:694-702.
- Rogers, J. A., and C. L. Davis. 1982. Effects of intraruminal infusions of mineral salts on volatile fatty acid production in steers fed high-concentrate and high-roughage diets. *J. Dairy Sci.* 65:953-962.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763-775.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., and W. V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Siddons, R. C., and J. Paradine. 1981. Effect of diet on protein degrading activity in the sheep rumen. *J. Sci. Food Agric.* 32:973-981.
- Sutton, J. D. 1981. Concentrate feeding and milk composition. Pages 35-48 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. W. Haresign, ed. Butterworths, London, UK.

- Udén, P., P. E. Colluci., and P. J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta rate passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31:625-632.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3588-3597.
- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, and E. C. Titgemeyer. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuffs evaluation. *J. Anim. Sci.* 76: 2717-2729.
- Varga, G. A., and E. C. Prigge. 1982. Influence of forage species and level of intake on ruminal turnover rates. *J. Anim. Sci.* 55:1489-1504.
- Vazquez-Añón, M., A. J. Heinrichs, J. M. Aldrich, and G. A. Varga. 1993. Postweaning age effect on rumen fermentation end products and digesta kinetics in calves weaned at 5 weeks of age. *J. Dairy Sci.* 76:2742-2748.

## **ARTÍCULO 2**

**Degradabilidad ruminal de siete suplementos proteicos vegetales estimada *in situ* en terneras alimentadas con dietas concentradas con distinta proporción de forraje y concentrado**



***In situ* degradability of seven plant protein supplements in heifers fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio.**

**Abstract**

Four Holstein heifers ( $297.5 \pm 27.7$  kg BW) fed high concentrate diets were used in a crossover experiment in order to characterize the rumen fermentation pattern, and to estimate by the *in situ* method rumen degradation kinetics of alfalfa hay and seven plant protein supplements: solvent-extracted soybean meal, solvent-extracted sunflower meal, peas (*Pisum sativum* L.), lupin seeds (*Lupinus* sp.), broadbean (*Vicia faba* L.), horsebean (*Vicia faba* L. var *equina*) and vetch (*Vicia sativa* L.), in high concentrate diets with different forage to concentrate ratio. Heifers were fitted with a ruminal cannula. The experiment was performed in two 30-d periods, 15 days of diet adaptation and 15 days of sampling. At each period, heifers were offered one of two total mixed rations (12:88 vs. 30:70 forage to concentrate ratio), two heifers per diet, on *ad libitum* basis. After the first period, heifers switched treatments. Intake of dry matter (DM), organic matter, crude protein and neutral detergent fiber (NDF), expressed as kg/d, did not differ between treatments, but DM intake, expressed as g/kg metabolic body weight (BW), was higher in the 12:88 diet. Average rumen pH was 6.0 in both diets, and the time pH was below 5.8, which is considered as a critical threshold for fiber degradation, was the same for both treatments ( $10.4 \pm 1.6$  h). Average ammonia nitrogen and volatile fatty acid (VFA) concentrations did not differ between treatments and individual VFA proportions were typical of high concentrate diets. Average effective degradability of DM ( $61.7 \pm 1.72$  %) and NDF ( $25.2 \pm 3.35$  %) of alfalfa hay were low and no differences were detected between treatments. The same extent of NDF degradation, together with the same proportions of VFA would indicate that both diets had the same fibrolytic activity. Forage to concentrate ratio did not affect rumen nitrogen degradability of any protein supplement incubated *in situ*. Corrected effective degradability for small particle losses of sunflower meal (78.1%) was higher than legume seeds, which were not statistically different between each other and ranged from 63.1 to 66.2 %. Soybean meal had the lowest degradability value (61.2%). These nitrogen degradation values must be considered more valid for beef cattle formulation of high concentrate diets than data obtained with forage diets.

**Key words:** Heifers, High concentrate diets, *In situ* nitrogen degradability, Plant protein supplements.

## 1. Introduction

The Mediterranean basin has traditionally grown legume seeds (*Fabaceae*) as a protein source for human and animal feeding. Even though these supplements have been used in the past for ruminant feeding, they are poorly characterized in current beef feeding systems (INRA, 1988; AFRC, 1993; NRC, 1996). Their present low consideration is mainly due to their variable, though high, protein content, the high rumen degradability of protein and the presence of antinutritional factors. The European Union banned the use of animal protein in ruminant nutrition in 1994. Since then, these plant protein supplements have aroused the interest of farmers, nutritionists and feed manufacturers due to their high protein content and potential for overcoming their limitations.

Available information on ruminal degradability of legume seeds as plant protein supplements is scarce, and data reported have usually been obtained in animals fed high forage diets, with a forage to concentrate ratio higher than commonly used in intensive beef production systems. This difference is important, because in high concentrate diets protein degradation is usually reduced (Ganev et al., 1979; Lindberg, 1981b; Molero et al., 2004). This reduction has been attributed to lower ruminal pH, which causes changes in protein solubility (Loerch et al., 1983) and reduces fibrolytic activity of rumen microflora (Mould and Ørskov, 1983; Hoover, 1986). Cellulose seems to protect proteins from degradation and it must be degraded to allow proteolysis (Ganev et al., 1979; Lindberg, 1981b; Devant et al., 2000).

The objectives of this study were to estimate the ruminal protein degradability of seven plant protein supplements in heifers fed high concentrate diets with two different forage to concentrate ratios and to examine ruminal fermentation of these two diets.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals, diets and housing

Four Holstein heifers with initial body weight (BW) of  $297.5 \pm 27.7$  kg fitted with ruminal cannula (i.d. 7.5 cm, Bar Diamond, Parma, ID) were used in a crossover design to study ruminal fermentation in animals fed two high concentrate diets with different forage to concentrate ratios, and to estimate ruminal degradability of plant protein supplements under those ruminal conditions.

The experiment consisted of two 30-d periods, 15 days for diet adaptation and 15 days for sampling. Two heifers were randomly assigned to each of the two

experimental diets (Table 1) and after the first sampling period, animals switched treatments.

**Table 1.** Ingredient and chemical composition of diets

	Diets <sup>a</sup>	
	12:88	30:70
Ingredient composition, % DM		
Corn, ground	34.35	24.50
Barley, ground	34.35	24.50
Soybean meal 44	11.80	4.90
Cane molasses	5.20	3.96
Barley straw	11.80	--
Soybean hulls	--	10.10
Dehydrated alfalfa	--	30.10
Minerals <sup>b</sup>	2.20	1.64
Vitamin, mineral premix <sup>c</sup>	0.30	0.30
Chemical composition, %DM <sup>d</sup>		
DM	86.91	87.21
OM	93.02	92.61
CP	15.26	15.01
EE	1.84	2.28
NDF	21.85	27.90
NFC	54.07	47.42

<sup>a</sup>Diets: 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>Minerals contained per kg DM: 353 g calcium carbonate, 246 g dicalcium phosphate, 201 g white salt and 201 g sodium bicarbonate.

<sup>c</sup>Vitamin and mineral premix contained per kg DM premix: 3,300 kIU vitamin A, 660 kIU vitamin D<sub>3</sub>, 2,100 IU vitamin E, 0.66 g thiamine, 0.66 g riboflavin, 2.2 mg vitamin B<sub>12</sub>, 26 mg choline chloride, 13.4 g Zn, 3.3 g Fe, 83.3 g S, 16.6 g Mn, 16.6 g Mg, 3.3 g Cu, 116.6 mg I, 166.6 mg Co, 66.6 mg Se, 100 mg ethoxyquin, 100 mg butylated hydroxytoluene.

<sup>d</sup>Chemical composition: OM, organic matter; CP, crude protein; EE, ether extract; NFC, non-fiber carbohydrates calculated as 100 - (CP + ash + NDF + EE).

Diets were isoenergetic (2.75 Mcal of metabolizable energy/kg dry matter (DM)) and isonitrogenous (15.1% of crude protein), and formulated to meet requirements for animals growing at 0.9 kg/d (NRC, 1996). Diets were designed to differ in the forage to concentrate ratio (12:88 *vs.* 30:70), the neutral detergent fiber (NDF) content (21.8% *vs.* 27.9%; DM basis), and the source of forage NDF (barley straw *vs.* dehydrated alfalfa). Subsequently, these diets will be referred to as 12:88 and 30:70. As dehydrated alfalfa is rich in protein, soybean hulls were also included in the 30:70 diet in order to keep protein content at 15% DM. The 12:88 diet would be similar to the diet commonly fed in intensive beef fattening in Spain, and the 30:70 diet would have similar chemical composition except for a higher NDF content. Both diets were offered as total mixed ration, once a day at 0800.

Animals were housed in indoor tied stalls, bedded with a rubber mat (2 x 1.4 m) with an individual feed bunk and with free access to feed and water. The research protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

## **2.2. Body weight and feed intake**

Body weight was recorded before feeding on two consecutive days at the beginning and at the end of the trial. Feed refusals were weighed daily before feeding and the offered ration was 115% of the previous day's intake. Feed and refusal samples were collected daily from d 1 to d 5 of the sampling period, and composited within animal to determine nutrient intake.

## **2.3. Ruminant sampling**

On d 13 of the sampling period, 30 min before the morning feeding, heifers were dosed intraruminally with chromium mordanted soybean meal (22.53 g/kg DM intake, representing 1.2 g Cr/kg DM intake) and CoEDTA (1 g/kg DM intake) in a 50-ml aqueous solution in order to estimate solid and liquid passage rate (Udén et al., 1980). A sample of 750 ml of ruminal content was collected with a vacuum pump from different locations in the rumen before the morning feeding and at 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24 and 36 h postfeeding, and squeezed through two layers of cheesecloth. Before marker administration, a sample of ruminal content was collected to know the background concentration of Co and Cr. After sampling, extra ruminal content was returned into the rumen. The pH of the ruminal fluid was measured immediately. Three subsamples were

taken at each sampling time, except at 0.5, 1 and 36 h postfeeding when samples were only taken for Co determination. First, a 4-ml subsample of strained fluid was acidified with 4-ml of 0.2 N HCl and frozen. Samples were later thawed in the refrigerator overnight, centrifuged at  $25,000 \times g$  for 20 min, and the supernatant fraction was analyzed for ammonia nitrogen by spectrophotometry (Chaney and Marbach, 1962). Second, 1 ml of a solution made up of 2 g/L mercuric chloride (to impede microbial growth), 20 ml/L orthophosphoric acid, and 2 g/L 4-methylvaleric (internal standard) in distilled water was added to 4 ml of strained ruminal fluid, which was then frozen (Jouany, 1982). Volatile fatty acids (VFA) were analysed with a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., UK) by gas chromatography using the G1530A (6890) model of the Hewlett Packard gas chromatograph (Hewlett Packard GmbH Chemische Analysentechnik, Waldbronn, Germany). Third, a 30-ml sample of strained ruminal fluid was frozen and stored. Samples were later centrifuged at  $25,000 \times g$  for 20 min before being analysed for Co concentration by atomic absorption spectrophotometry (Udén et al., 1980).

Ruminal solids were collected for Cr analysis from d 13 to d 15 before the morning feeding and at 4 and 12 h postfeeding. Samples were dried at  $103^{\circ}\text{C}$  over 48 h and Cr concentration was determined according to the procedure of Le Du and Penning (1982) by atomic absorption spectrophotometry.

#### **2.4. *In situ* incubations**

Seven plant protein supplements were incubated *in situ* from d 6 to 12 of each sampling period, to estimate effective ruminal degradability of nitrogen. Protein supplements (Table 2) were solvent-extracted soybean meal, solvent-extracted sunflower meal, peas (*Pisum sativum* L.), lupin seeds (*Lupinus* sp.), broadbean (*Vicia faba* L.), horsebean (*Vicia faba* L. var. *equina*) and vetch (*Vicia sativa* L.). Alfalfa hay was also incubated at the same time to estimate ruminal degradation of DM and NDF.

Samples were ground through a 3-mm screen (Hammer mill, P. Prats S. A., Sabadell, Spain). Plant protein sources (1.5 g, except for 1.0 g for soybean meal; as-fed basis) and alfalfa hay (2.0 g; as-fed basis) were weighed in  $5 \times 10$  cm nylon bags made of nitrogen free polyester (Ankom Technology Co., Fairport, NY) with a mean pore size of  $50 \pm 15 \mu\text{m}$  and heat sealed (Dea Lun Co., Ltd, Taiwan). Bags were soaked in warm water for 30 min and placed into the rumen for 2, 4, 8, 12, 24, 36 and 48 h for protein

supplements, whereas alfalfa hay was incubated for 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 and 96 h. Bags were placed in the rumen at the same time and removed sequentially. One empty bag for each hour and diet was included and used as a blank in nitrogen analysis. This sequence was repeated twice within each period and the two sequences of disappearance were treated as replications for statistical analyses. The bags were removed, rinsed briefly in a bucket of cold water, then rinsed three cycles of 5 min with cold water in a semi automatic washing machine, and dried at 103°C over 24 h. Alfalfa hay residues were dried at 60°C over 72 hours. Washing losses (time 0) were measured in two bags per sample treated as mentioned above but without rumen incubation. Bag residues of protein supplements, were analyzed for DM and nitrogen, and alfalfa hay residues for DM and NDF. True water soluble nitrogen of protein supplements was measured on filter paper (Whatman No. 2) and particle loss as the difference between washing losses and truly water soluble fraction (Hvelplund and Weisbjerg, 2000). Bag residues were not corrected for microbial contamination because the underestimation caused by this contamination is dependent on protein content (Nozière and Michalet-Doreau, 2000), being especially necessary with low-protein and high-fiber feedstuffs (Vanzant et al., 1998), which was not the case here.

**Table 2.** Chemical composition as % of dry matter of plant protein supplements and alfalfa hay, and water soluble nitrogen of plant protein supplements, measured by the Weisbjerg test (true water solubility) and by zero time washing losses (%soluble N/total N).

Feedstuff	DM	OM	CP	NDF	True water sol.	Washing losses
Soybean meal	86.99	87.39	49.06	12.08	9.21	16.74
Sunflower meal	90.57	83.33	33.78	37.84	16.62	26.75
Peas	87.43	91.04	22.97	8.29	19.52	41.71
Lupin seeds	91.20	88.58	34.37	23.87	18.84	28.62
Broadbean	88.24	85.45	27.88	19.57	25.16	61.61
Horsebean	88.94	85.88	29.93	22.18	19.46	48.65
Vetch	89.63	86.62	27.82	14.92	18.75	36.54
Alfalfa hay	85.69	82.06	19.82	29.93	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>

<sup>a</sup>ND= Not determined.

## 2.5. Feed refusals and supplements analyses

Feeds, refusals and supplements were analysed for DM (24 h at 103°C) and ash (4 h at 550°C). Nitrogen content was determined using the Kjeldahl method (procedure 976.05 AOAC, 1990) with selenium as catalyst. NDF content was determined by Van Soest et al. (1991) with sodium sulfite, heat stable alpha amylase and expressed exclusive of residual ash. Ether extract from diets was analysed according to procedure 920.39 of AOAC methods (1990).

## 2.6. Calculations

Ruminal fluid pH, ammonia nitrogen and VFA measures postfeeding were averaged across time by calculating the area under the ruminal data *vs.* time curve and dividing by total time (Pitt and Pell, 1997). The same procedure was used to calculate mean daily hours and area under the curve at pH 6.0 or 5.8 (Nocek et al., 2002). Ruminal fluid and solid passage rates (kp) were calculated as the slope of the regression line of the natural logarithm of Co or Cr concentration *vs.* time, respectively (Faichney, 1975). Ruminal degradation of nitrogen of the plant protein supplements was determined using the Ørskov and McDonald (1979) model with the fractional passage rate estimated with Cr. Effective degradation (ED) was calculated using the equation  $ED = a + [(b \times c)/(c + kp)]$ , where a, b, c and kp are soluble fraction, insoluble but potentially degradable fraction, rate of degradation and fractional rate of passage, respectively. Total degradable fraction (a + b) was restricted to be lower than 100. Ruminal degradation of DM and NDF of alfalfa hay were determined using the model of Dhanoa (1988) with the same fractional rate of passage used for the protein supplements. These models were adjusted by the NLIN procedure of SAS 8.2 (SAS Inst., Inc., Cary, NY). Constants of degradation a and b of protein supplements were corrected for particle losses by the equations proposed by Hvelplund and Weisbjerg (2000) assuming that particle losses are degraded similarly to the particles remaining in the bag:  $a_c = a - P$ ;  $b_c = b + P \times [b / (100 - (P + SOL))]$  and  $c_c = c$  (as this is the assumption) where P = loss of small particles and SOL = water solubility.

## 2.7. Statistical analyses

Data were analysed using PROC MIXED (Littell et al., 1996) of SAS with a model adequate for a crossover design. The model contained the effect of diet, period and their interaction as fixed effects. Period was used as repeated factor and animal as

random effect. The restricted maximum likelihood method was used to estimate the variance components and the Satterthwaite method was used to approximate the degrees of freedom. For each analyzed variable, data were subjected to four covariance structures: variance components, compound symmetric, one-band unstructured and autoregressive order one. The covariance structure that yielded the smallest Akaike and Schwarz's Bayesian criterion was considered to be the most desirable for analysis. Comparisons among nitrogen constants of degradation of protein supplements were analysed with the same model as described before, including the supplement and its interaction with main factors as fixed effects. Differences among means were tested using the Tukey option of SAS. Ruminal data collected at different times after feeding were analysed with the same model, except that the repeated factor was the interaction of time after feeding with period. Time after feeding and its interaction with main factors were included as fixed effect.

### 3. Results

#### 3.1. Animal performance

Daily gain averaged  $1.04 \pm 0.05$  kg between 297 and 374 kg BW in both treatments. No differences were observed in DM ( $8.1$  vs.  $7.0 \pm 1.09$  kg/d), organic matter ( $7.5$  vs.  $6.5 \pm 1.01$  kg/d), crude protein ( $1.2$  vs.  $1.1 \pm 0.16$  kg/d) and NDF ( $1.6$  vs.  $1.8 \pm 0.22$  kg/d) intake between 12:88 and 30:70 diet, respectively. However DM intake, expressed as g/kg of metabolic BW was higher in the 12:88 diet ( $101.8$  vs.  $90.11 \pm 8.59$ ;  $P < 0.05$ ).

#### 3.2. Ruminal fermentation

No differences were observed for the ruminal fermentation end products (Table 3). Average ( $6.00 \pm 0.08$ ), lowest ( $5.48 \pm 0.03$ ) and highest pH ( $7.06 \pm 0.18$ ) were not different between treatments. There were no differences between diets in the mean daily hours when pH was below 6.0 ( $14.23 \pm 1.85$  h) or 5.8 ( $10.36 \pm 1.59$  h), or the area under the curve for a pH of 6.0 ( $80.84 \pm 10.33$  pH x  $\text{hd}^{-1}$ ) or 5.8 ( $58.14 \pm 8.68$  pH x  $\text{hd}^{-1}$ ). No diet x time after feeding interaction was observed for the postprandial evolution of ruminal pH (Figure 1a). Total VFA concentration, its daily evolution (Figure 1b), and the proportions of individual VFA did not differ between diets. Diurnal variation of total VFA evolved concurrently with ruminal pH, peaking at the time in which pH started to increase.



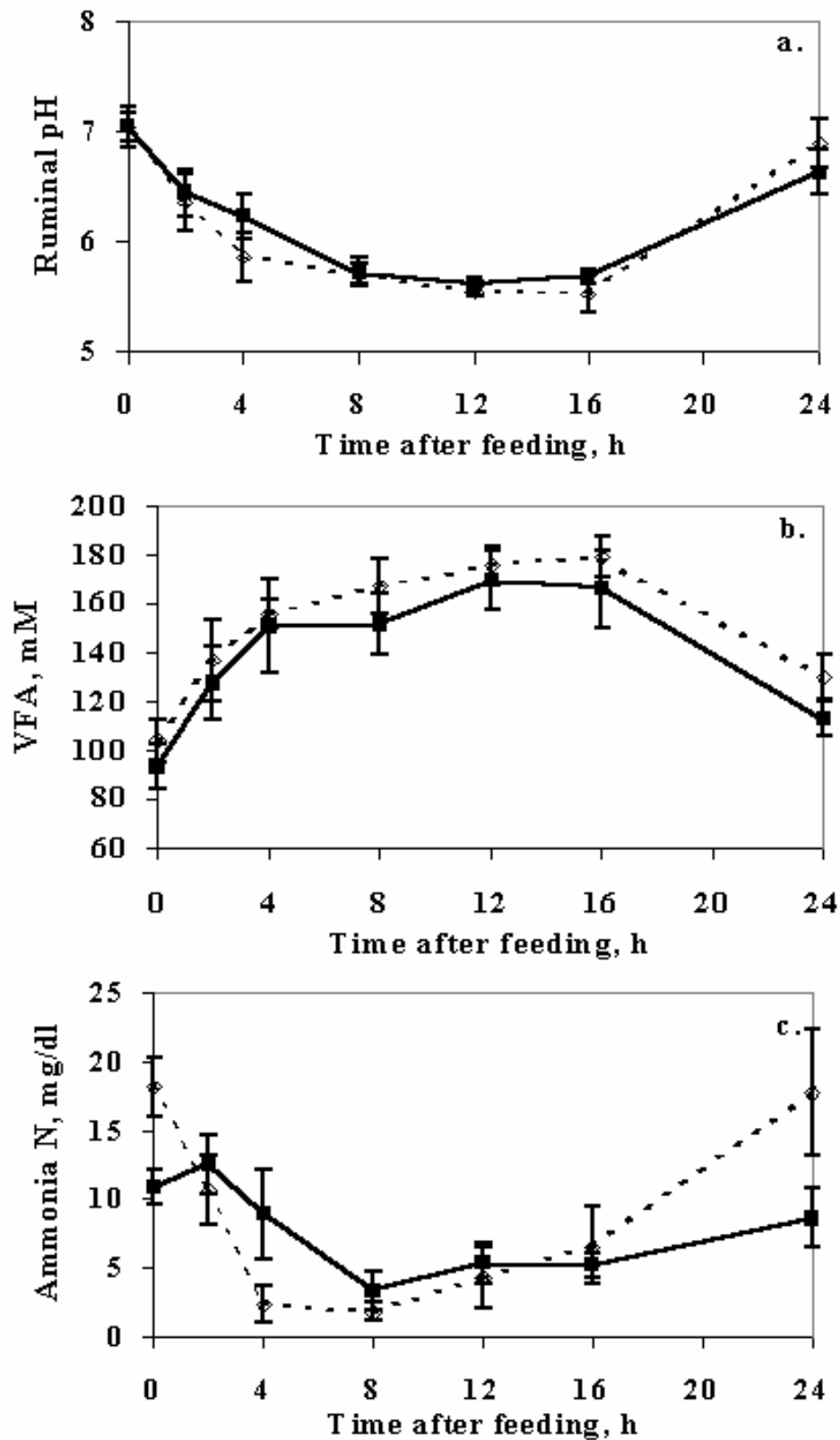
Ammonia nitrogen concentration averaged  $10.28 \pm 2.26$  mg/100 ml, and no differences were observed between diets. A time after feeding  $\times$  diet interaction was detected as a result of greater diurnal fluctuation of ammonia nitrogen concentrations in heifers consuming the 12:88 diet (Figure 1c;  $P < 0.05$ ). No differences were observed in fluid and solid passage rates between diets, and averaged  $9.3 \pm 2.14$  and  $5.7 \pm 0.71$  %/h, respectively.

**Table 3.** Effect of forage to concentrate ratio on ruminal fermentation.

Item	Diet <sup>a</sup>		SEM	P-value
	12:88	30:70		
Ruminal pH				
Average	5.97	6.04	0.08	0.622
Lowest	5.41	5.55	0.03	0.137
Highest	7.06	7.06	0.18	0.999
Ammonia nitrogen, mg/100 ml	10.55	10.07	2.26	0.699
Total VFA, mM	158.83	147.39	6.00	0.267
BCVFA <sup>b</sup> , mM	1.84	2.03	0.23	0.178
VFA, mol/100 mol				
Acetate	58.50	54.49	1.75	0.203
Propionate	27.63	31.10	2.63	0.405
Butyrate	10.53	10.79	0.96	0.864
Isobutyrate	0.71	0.77	0.08	0.632
Valerate	1.60	1.61	0.07	0.966
Isovalerate	1.13	1.25	0.15	0.088
Acetate: propionate ratio	2.24	1.86	0.23	0.300
Passage rate, %/h				
Fluid	8.58	9.92	2.14	0.338
Solid	5.96	5.38	0.71	0.805

<sup>a</sup>Diet: Mean data across periods, 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>BCVFA: Branch chained VFA, mM concentration of isobutyrate and isovalerate.



**Figure 1.** Ruminal pH (a), total VFA concentration (b), and concentration of ruminal ammonia nitrogen (c) with time after feeding in 12:88 and 30:70 diets, represented as dotted line and solid line, respectively.

### 3.3. Degradation kinetics of plant protein supplements

Forage to concentrate ratio had no effect on degradation constants of the protein supplements incubated *in situ* (Table 4). Soluble fractions of all protein supplements were significantly different from each other (Table 5;  $P < 0.05$ ). Soybean meal had the lowest soluble fraction and broadbean the highest, with sunflower meal, lupin seeds, vetch, peas and horsebean in ascending order in between. Inversely to the soluble fraction, insoluble but potentially degradable fraction of feeds were ranked from 39.3 to 82.2 % for broadbean and soybean meal respectively, with horsebean, peas, vetch, sunflower meal and lupin seeds in ascending order in between. Rate of degradation was significantly higher in sunflower meal (28.3 %/h) compared to all other incubated supplements, which ranged from 7.1 to 8.1 %/h. Effective degradation ranked from 64.3 to 81.3 % for soybean meal and broadbean respectively, with lupin seeds, vetch, peas, horsebean and sunflower meal in ascending order in between.

### 3.4. Degradation kinetics of protein supplements corrected for loss of small particles

True water solubility of all protein supplements was lower than the washing losses, the difference being attributed to the small particles that escape from the bag (Table 2). This loss was bigger for broadbean and horsebean (36.4 and 29.2 %, respectively) and smaller for soybean meal (7.5%), with lupin seeds, sunflower meal, vetch and peas in ascending order in between. After correction for this loss, the soluble fraction was lower for all supplements (Table 5), ranking from 9.2 to 23.4 % for soybean meal and broadbean, respectively. The insoluble but potentially degradable fraction was higher in all supplements, and ranked from 72.5 to 89.7 % for sunflower meal and soybean meal, respectively. Corrected effective degradability was lower for all supplements. Corrected ED of sunflower meal was higher than all the other legume seeds which ranged from 63.1 to 66.2 %. Soybean meal had the lowest degradability value (61.2%).

### 3.5. Degradation kinetics of alfalfa hay

Soluble fraction of DM was higher ( $P = 0.02$ ) and the potentially degradable fraction tended to be lower ( $P < 0.1$ ) in the 30:70 diet (Table 6). No differences were observed for the rate of degradation or ED of DM and NDF between treatments. The lag time of DM degradation tended to be higher in the 30:70 than in 12:88 diet.

**Table 4.** Effect of forage to concentrate ratio on degradation constants of nitrogen of the plant protein supplements incubated *in situ*.

Feedstuff	Diet <sup>a</sup>		SEM	P-value
	12:88	30:70		
<b>Soybean meal</b>				
a <sup>b</sup> , %	16.9	16.6	0.89	0.607
b, %	82.8	81.7	1.56	0.557
c, %/h	7.9	8.4	1.32	0.816
ED, %	63.8	64.8	3.24	0.666
ED <sub>c</sub> , %	60.5	61.6	3.53	0.667
<b>Sunflower meal</b>				
a, %	29.7	27.6	1.45	0.403
b, %	63.1	64.3	2.23	0.745
c, %/h	24.9	31.7	4.89	0.410
ED, %	79.9	81.6	2.51	0.572
ED <sub>c</sub> , %	77.1	79.1	2.86	0.672
<b>Peas</b>				
a, %	42.3	42.4	1.02	0.979
b, %	57.4	56.9	1.42	0.835
c, %/h	6.7	9.4	1.29	0.138
ED, %	73.0	77.4	1.93	0.183
ED <sub>c</sub> , %	62.6	68.6	2.95	0.085
<b>Lupin seeds</b>				
a, %	31.1	31.0	0.37	0.765
b, %	68.7	68.7	0.58	0.995
c, %/h	7.7	8.1	0.82	0.227
ED, %	70.2	70.8	1.62	0.801
ED <sub>c</sub> , %	66.1	66.8	1.84	0.801
<b>Broadbean</b>				
a, %	60.4	59.4	1.01	0.552
b, %	39.6	39.0	1.66	0.806
c, %/h	6.4	7.7	1.01	0.219
ED, %	81.3	81.4	1.08	0.887
ED <sub>c</sub> , %	63.5	63.7	2.11	0.887
<b>Horsebean</b>				
a, %	47.8	48.8	0.43	0.241
b, %	52.0	49.1	0.73	0.154
c, %/h	6.5	8.7	1.55	0.184
ED, %	74.3	77.1	2.19	0.410
ED <sub>c</sub> , %	61.3	65.0	3.38	0.412
<b>Vetch</b>				
a, %	36.7	37.5	0.97	0.607
b, %	61.2	58.7	2.06	0.465
c, %/h	8.1	7.6	2.78	0.905
ED, %	71.4	74.2	3.21	0.583
ED <sub>c</sub> , %	63.4	67.0	4.25	0.603

<sup>a</sup>Diet: Mean data across periods, 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio, DM basis.

<sup>b</sup>Degradation constants: a = soluble fraction; b = insoluble but potentially degradable fraction; c = rate of degradation; ED = Effective degradability; ED<sub>c</sub> = Effective degradability corrected for loss of small particles.

**Table 5.** Comparison of the degradation constants of nitrogen of protein supplements incubated *in situ*, without correction and corrected for small particle loss.

Feedstuff	Degradation constants <sup>a</sup>						
	a, %	a <sub>c</sub> , %	b, %	b <sub>c</sub> , %	c, %/h	ED, %	ED <sub>c</sub> , %
Soybean meal	16.7 <sup>z</sup>	9.2 <sup>w</sup>	82.2 <sup>t</sup>	89.7 <sup>t</sup>	8.1 <sup>u</sup>	64.3 <sup>w</sup>	61.2 <sup>v</sup>
Sunflower meal	28.6 <sup>y</sup>	18.5 <sup>v</sup>	63.7 <sup>v</sup>	72.5 <sup>v</sup>	28.3 <sup>t</sup>	80.7 <sup>t</sup>	78.1 <sup>t</sup>
Peas	42.3 <sup>v</sup>	20.2 <sup>v,u</sup>	57.1 <sup>w</sup>	78.9 <sup>u</sup>	8.0 <sup>u</sup>	75.2 <sup>u</sup>	65.6 <sup>u</sup>
Lupin seeds	31.1 <sup>x</sup>	21.3 <sup>u</sup>	68.7 <sup>u</sup>	78.1 <sup>u</sup>	7.9 <sup>u</sup>	70.5 <sup>v</sup>	66.2 <sup>u</sup>
Broadbean	59.9 <sup>t</sup>	23.4 <sup>t</sup>	39.3 <sup>y</sup>	76.6 <sup>u,v</sup>	7.1 <sup>u</sup>	81.3 <sup>t</sup>	63.6 <sup>u,v</sup>
Horsebean	48.3 <sup>u</sup>	19.1 <sup>v</sup>	50.1 <sup>x</sup>	79.3 <sup>u</sup>	7.6 <sup>u</sup>	76.3 <sup>u</sup>	63.1 <sup>u,v</sup>
Vetch	37.1 <sup>w</sup>	19.3 <sup>v,u</sup>	59.9 <sup>w</sup>	76.8 <sup>u,v</sup>	7.9 <sup>u</sup>	72.8 <sup>u,v</sup>	65.2 <sup>u,v</sup>
SEM	0.71	0.71	1.08	1.47	1.62	1.86	2.51

<sup>a</sup>Degradation constants: a = soluble fraction; a<sub>c</sub> = soluble fraction corrected for small particle loss; b = insoluble but potentially degradable fraction; b<sub>c</sub> = fraction b corrected for small particle loss; c = rate of degradation; ED = Effective degradability; ED<sub>c</sub> = Effective degradability corrected for small particle loss.

<sup>t-z</sup>Different superscript in columns means significant differences between supplements ( $P < 0.05$ ).

## 4. Discussion

### 4.1. Ruminal fermentation

The pH averaged 6.0 in both diets, and the time pH was below a threshold considered critical for acidosis was the same for both treatments. In any case, no clinical signs of acidosis were detected and animals grew as expected. Total VFA concentration was within normal ranges (France and Siddons, 1993). The proportions of individual VFA were normal for high concentrate diets (Rogers and Davis, 1982; Devant et al., 2000; Rotger et al., 2005). The lack of differences in the proportion of acetate or in the acetate to propionate ratio between diets indicated that the higher forage proportion of the 30:70 diet did not enhance the fibrolytic fermentation, as there were no significant differences in NDF intake between diets. Also forage source had no significant effect on VFA concentrations.

Average ammonia nitrogen concentration, in both diets, was above the level referred to optimise microbial growth (Satter and Slyter, 1974).

**Table 6.** Effect of forage to concentrate ratio on degradation constants of DM and NDF of alfalfa hay incubated *in situ*.

Item	Diet <sup>a</sup>		SEM	P-value
	12:88	30:70		
Soluble fraction, %				
DM	41.3	46.2	0.73	0.020
NDF	6.5	6.0	1.73	0.822
Insoluble but potentially degradable fraction, %				
DM	35.6	29.2	0.83	0.053
NDF	41.4	42.9	3.93	0.863
Rate of degradation, %/h				
DM	7.2	7.4	1.01	0.389
NDF	5.3	4.5	1.01	0.274
Effective degradability, %				
DM	60.9	62.5	1.72	0.132
NDF	25.8	24.5	3.35	0.336
Lag time, %				
DM	2.35	4.19	0.430	0.084
NDF	3.05	3.16	0.450	0.903

<sup>a</sup>Diet: Mean data across periods, 12:88 and 30:70 forage to concentrate ratio.

The time after feeding x diet interaction detected in postprandial fluctuation of ammonia nitrogen concentration could be attributed to higher utilisation of ammonia nitrogen for microbial protein synthesis after feeding in the 12:88 diet. As the 12:88 diet had a higher DM intake, more dietary nonstructural carbohydrates were fermented after feeding and energy was rapidly available for microbial protein synthesis (Bourquin et al., 1994).

Fluid passage rate was similar to the averages reported by Owens and Goetsch (1986) for high concentrate diets and high intake, but the solid passage rate was more similar to the value obtained by Devant et al. (2001), in similar experimental conditions.

#### 4.2. Degradation kinetics of plant protein supplements and alfalfa hay

Basal diet has long been known to affect degradation kinetics of feedstuffs incubated *in situ* (Van Keuren and Heinemann, 1962). Plant protein supplements have higher degradability in high forage diets than in concentrate diets (Mould and Ørskov, 1983), because protein in these supplements is protected by a cellulose structure which

must be degraded in order to allow proteolysis (Ganev et al., 1979). Many other studies have observed differences in the degradability of feedstuffs due to the forage to concentrate ratio of the basal diet, though the results are inconsistent and most studies did not characterize ruminal fermentation profile in order to explain the observed differences. Lindberg (1981b) observed that degradability of forages was more sensitive to changes in basal diet than concentrates because they contained a higher proportion of cellular wall. Contrarily, the same author (Lindberg, 1981a) found a higher degradability of some concentrates in low forage diets. Woods et al. (2002) found no differences in *in situ* degradation of feedstuffs between diets differing in the forage to concentrate ratio. Molero et al. (2004) observed higher degradation for some protein supplements in the high forage diet, when extremely different forage:concentrate ratio diets were compared, but these differences disappeared when experimental diets were more similar in their forage to concentrate ratio. In the present experiment, within the ranges of forage to concentrate ratio studied, diet did not affect ruminal conditions, or the fibrolytic activity estimated from NDF degradation, so differences in protein degradability were not detected. The low ED of NDF of alfalfa hay is probably due to the low rumen fibrolytic activity in both treatments, caused mainly by a substrate effect, both being high concentrate diets. As dietary nonstructural carbohydrates are easily fermented and will be degraded first, and large amounts of roughage were never consumed, a microflora capable of cellulose degradation would not develop spontaneously to degrade the hay sample introduced in the nylon bags (Mould and Ørskov, 1983). Postprandial pH fell to 5.5, a level which is supposed to inhibit cellulolysis (Hoover, 1986), but as ruminal pH was below 5.8 for less than 12h a day, it would not seriously reduce cellulose fermentation (Calsamiglia et al., 2002).

Effective degradability of soybean meal, with or without correction for small particle losses was lower than that recorded *in situ* by Woods et al. (2002), in steers fed diets higher in forage to concentrate ratio. In the case of sunflower meal, the ED was higher than the value given by Susmel et al. (1989), obtained with a cow fed a 50 to 50 forage to concentrate ratio diet. When the ED of sunflower meal was corrected for small particle losses, the two values were closer. Corrected ED of soybean meal and sunflower meal were close to the values used by AFRC (1993) and INRA (1988). In contrast, nitrogen ED of legume seeds, with or without correction for losses of small particles, was lower than that obtained in other *in situ* studies that incubated peas (Walhain et al., 1992; Petit et al., 1997), lupin seeds (Cros et al., 1991a; Kibelolaud et

al., 1993) or samples of genus *Vicia* (Cros et al., 1991b; Benchaar et al., 1994; Djouvinov et al., 1998), and much lower than the values reported in feeding systems, probably due to the low forage to concentrate ratio of diets used in the present experiment.

The observed differences in the rate and extent of degradation between supplements may indicate that protein degradation is more determined by the secondary or tertiary structure of protein than by solubility (Wallace and Cotta, 1988). Having lower nitrogen solubility, sunflower meal was degraded faster than all the group of legume seeds, which probably, as they belong to the same family, had a more similar protein structure, different from sunflower meal.

Samples were milled to increase homogeneity and to simulate the mastication process before their introduction in nylon bags and subsequent incubation in the rumen, so small particles may escape through the pores of the bag, without being degraded. These particles represent the washing losses and according to the equation used to fit data, will be regarded as soluble and immediately degraded, which is probably not true. Hvelplund and Weisbjerg (2000) emphasized the need to measure the water soluble fraction of feed supplements because losses of small particles during soaking and washing leads to an overestimation of the soluble fraction and consequently of rumen degradation. Estimated soluble fraction corrected for small particle losses was lower in all samples and it was consistent with the content of water soluble proteins (albumins) of legume seeds (Colonna et al., 1995).

## 5. Conclusions

Differences in forage to concentrate ratio between diets did not alter the rumen fermentation profile and, consequently, had no effect on the nitrogen degradation kinetics of plant protein supplements incubated *in situ*. The rate and extent of the nitrogen degradation of legume seeds were lower than values reported in recent research, which were obtained with animals fed higher forage diets than in the present experiment. The effective degradability values of plant protein supplements obtained in the present experiment, after correction for small particle losses, must be considered more valid for beef cattle receiving high concentrate diets and recommendable for use by farmers, nutritionists and feed manufacturers than data obtained with high forage diets.



## 6. Literature cited

- AFRC, 1993. Energy and Protein Requirements of Ruminants. Agric. Food Res. Council Tech. Comm. on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Benchaar, C., Vernay, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., 1994. Effects of extrusion of whole horsebeans on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77, 1360-1371.
- Bourquin, L. D., Titgemeyer, E. C., Merchen, N. R., Fahey, G. C. Jr., 1994. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: I. Site and extent of organic matter, nitrogen, and cell wall digestion. *J. Anim. Sci.* 72, 746-758.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., Devant, M., 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85, 574-579.
- Chaney, A. L., Marbach, E. P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130-132.
- Colonna, P., Buleón, A., Leloup, V., Thibault, J. F., Renard, C., Lahaye, M., Viroben, G., 1995. Constituants des céréales, des graines, des fruits et de leurs sous-produits. In: Jarrige, R., Ruckebusch, Y., Demarquilly, C., Farce, M.-H., Journet, M. (Eds), *Nutrition des Ruminants Domestiques*. INRA Editions, Paris, pp. 83-121.
- Cros, P., Benchaar, C., Bayourthe, C., Vernay, M., Moncoulon, R., 1991a. *In situ* evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole lupin seed nitrogen. *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 575-583.
- Cros, P., Vernay, M., Moncoulon, R., 1991b. *In situ* evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole horsebeans. *Reprod. Nutr. Dev.* 31, 249-255.
- Devant, M., Ferret, A., Gasa, J., Calsamiglia, S., Casals, R., 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78, 1667-1676.
- Devant, M., Ferret, A., Calsamiglia, S., Casals, R., Gasa, J., 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79, 1944-1953.

- Dhanao, M. S., 1988. Research note: on the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass Forage Sci.* 43, 441-444.
- Djouvinov, D. S., Nakashima, Y., Todorov, N., Pavlov, D., 1998. *In situ* degradation of feed purines. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71, 67-77.
- Faichney, G. J., 1975. The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. In: McDonald, I. W., Warner, A. I. C. (Eds), *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. University of New England Publishing Unit, Armidale, New South Wales, Australia, pp. 277-291.
- France, J., Siddons, R. C., 1993. Volatile fatty acids production. In: Forbes, J. M., France, J. (Eds), *Quantitative aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 107-121.
- Ganev, G., Ørskov, E. R., Smart, R., 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *J. Agric. Sci.* 93, 651-656.
- Hoover, W. H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69, 2755-2766.
- Hvelplund, T., Weisbjerg, M. R., 2000. *In situ* techniques for the estimation of protein degradability and postrumen availability. In: Givens, D. I., Owens, E., Axford, R. F. E., Omed, H. M. (Eds), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 233-258.
- INRA, 1988. *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. INRA Editions, Paris.
- Jouany, J. P., 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliments* 2, 131-144.
- Kibelolaud, A. R., Vernay, M., Bayourthe, C., Moncoulon, R., 1993. Effect of extruding on ruminal disappearance and lower gastrointestinal tract digestion of white lupin seeds. *Can. J. Anim. Sci.* 73, 571-579.
- Le Du, Y. L. P., Penning, P. D., 1982. Animal based techniques for estimating herbage intake. In: Leaver, J. D. (Ed), *Herbage Intake Handbook*. Grassland Res. Inst., Hurley, UK, pp. 37-75.
- Lindberg, J. E., 1981a. Rumen degradation pattern of dry matter and nitrogenous compounds of some concentrates studied with the nylon-bag technique. *Swed. J. Agric. Res.* 11, 171-176.

- Lindberg, J. E., 1981b. The effect of basal diet on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. *Swed. J. Agric. Res.* 11, 159-169.
- Littell, R. C., Milliken, G. A., Stroup, W. W., Wolfinger, R. D., 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Loerch, S. C., Berger, L. L., Gianola, D., Fahey, G. C. Jr., 1983. Effects of dietary protein source and energy level on *in situ* nitrogen disappearance of various protein sources. *J. Anim. Sci.* 56, 206-216.
- Molero R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Losa, R., 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114, 91-104.
- Mould, F. L., Ørskov, E. R., 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis *in sacco*, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10, 1-14.
- Nocek, J. E., Kautz, W. P., Leedle, J. A. Z., Allman, J. G., 2002. Ruminal supplementation of direct fed microbials on diurnal pH variation and *in situ* digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 429-433.
- Nozière, P., Michalet-Doreau, B., 2000. *In sacco* methods. In: D'Mello, J. P. F. (Ed), *Farm Metabolism and Nutrition*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 233-253.
- NRC, 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Ørskov, E. R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Camb.)* 92, 499-503.
- Owens, F. N., Goetsch, A. L., 1986. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: Milligan, L. P., Grovum, W. L., Dobson, A. (Eds), *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, pp. 196-223.
- Petit, H. V., Rioux, R., Ouellet, D. R., 1997. Milk production and intake of lactating cows fed raw or extruded peas. *J. Dairy Sci.* 80, 3377-3385.
- Pitt, R. E., Pell, A. N., 1997. Modeling ruminal pH fluctuations: Interactions between meal frequency and digestion rate. *J. Dairy Sci.* 80, 2429-2441.

- Rogers, J. A., Davis, C. L., 1982. Rumen volatile fatty acid production and nutrient utilisation in steers fed a diet supplemented with sodium bicarbonate and monensin. *J. Dairy Sci.* 65, 944-952.
- Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S., Manteca, X. 2005. Changes in ruminal fermentation and protein degradation in growing Holstein heifers fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratios. *J. Anim. Sci.* 83 (*in press*).
- Satter, L. D., Slyter, L. L., 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32, 199-208.
- Susmel, P., Stefanon, B., Mills, C. R., Colitti, M., 1989. The evaluation of PDI concentrations in some ruminant feedstuffs: a comparison of *in situ* and *in vivo* protein degradability. *Ann. Zootech.* 38, 269-283.
- Udén, P., Colucci, P. E., Van Soest, P. J., 1980. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food Agric.* 31, 625-632.
- Van Keuren, R. W., Heinemann, W. W., 1962. Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. *J. Anim. Sci.* 21, 121-129.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Vanzant, E. S., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C., 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuffs evaluation. *J. Anim. Sci.* 76, 2717-2729.
- Wallace, R. J., Cotta, M. A., 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. In: Hobson, P. N. (Ed), *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science, NY, pp. 217-250.
- Walhain, P., Foucart, M., Théwis, A., 1992. Influence of extrusion and intestinal disappearance *in sacco* of pea (*Pisum sativum*) proteins and starch. *Anim. Feed Sci. Technol.* 38, 43-55.
- Woods, V. B., O'Mara, F. P., Moloney, A. P., 2002. The *in situ* ruminal degradability of concentrate feedstuffs in steers as affected by level of feed consumption and ratio of grass silage to concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 100, 15-30.

### **ARTÍCULO 3**

**Efectos de las fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína sobre la ingestión, digestibilidad aparente de todo el tracto y metabolismo ruminal estudiado *in vivo* e *in vitro* con dietas concentradas para terneros de engorde.**

**Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility and ruminal metabolism studied *in vivo* and *in vitro* with high concentrate beef cattle diets.**

**Abstract**

Four rumen fistulated Holstein heifers (BW  $132.3 \pm 1.61$  kg) fed high concentrate diets were assigned to a 4 x 4 Latin square design with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments to investigate the effects of synchronizing nonstructural carbohydrate (NSC) and protein degradation on animal performance and rumen microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro* with a dual flow continuous culture system. Two NSC sources (barley and corn) and two protein sources (soybean meal, SBM, and sunflower meal, SFM) differing in their rate and extent of ruminal degradation were combined resulting in a synchronized rapid fermentation diet (barley-SFM); a synchronized slow fermentation diet (corn-SBM) and two unsynchronized diets with a rapidly and a slowly fermenting component (barley-SBM and corn-SFM). *In vitro*, the effect of pH, constant at 6.2 or 12 h at 6.4 and 12 h at 5.8, was also tested. Synchronization tended to result in higher true OM digestion ( $P = 0.072$ ), VFA concentration ( $P = 0.067$ ) and microbial N flow ( $P = 0.092$ ) *in vitro*, but had no effects on *in vivo* fermentation pattern or on apparent total tract digestibility. The NSC source affected *in vitro* the efficiency of microbial protein synthesis, tending to be greater ( $P = 0.07$ ) for barley based diets, and *in vivo* affected heifer performance. Dry matter and OM intake tended to be higher ( $P \leq 0.06$ ) in corn than barley based diets, with no effect on ADG ( $1.2 \pm 0.11$  kg/d). Consequently, feed efficiency was higher ( $P = 0.018$ ) for barley based diets. *In vivo* and *in vitro* ammonia N concentration was lower ( $P \leq 0.07$ ) for corn than barley based diets and below the minimum required to maximize microbial growth, with no negative effects on ruminal fermentation. *In vitro*, pH could be reduced from 6.4 to 5.8 for 12 h a day without any effect on ruminal fermentation or microbial protein synthesis. In summary, ruminal synchronization seemed to have positive effects on *in vitro* fermentation, but *in vivo* recycling of endogenous N or intake differences could mask these effects and the NSC source could have a more determining effect. Barley based diets had a better feed conversion, with no problems of ruminal acidosis.

**Key words:** Ruminal fermentation, High concentrate diets, NSC and protein synchrony

## 1. Introduction

Nonstructural carbohydrates (NSC) and proteins from feedstuffs have different rate and extent of ruminal degradation, being the main factors controlling the availability of energy and nitrogen compounds for microbial growth (Hoover and Stokes, 1991).

Corn and barley are the main cereal grains used in high concentrate beef cattle diets. Barley has a lower content of NSC but of higher rate and extent of rumen degradation than corn (Herrera-Saldana et al., 1990b). Although there is extensive research on the effects of synchronizing these NSC sources on microbial fermentation and animal performance using dairy cattle diets (Nocek and Russell, 1988; Herrera-Sadana et al., 1990a; Casper et al., 1999), few efforts have been made in high concentrate beef cattle diets to improve ruminal fermentation by synchronizing these energy sources with protein supplements with similar degradation characteristics.

High concentrate diets are rapidly fermented in the rumen, leading to high concentrations of VFA in ruminal fluid and relatively low ruminal pH (Beauchemin et al., 2001). Low ruminal pH may affect fiber and protein degradation (Hoover, 1986; Shiver et al., 1986) and efficiency of microbial protein synthesis (Strobel and Russell, 1986).

The objectives of this work were to examine the effects of synchrony of nutrient release from NSC and protein sources, with different rates and extents of ruminal degradation, on: a) Ruminal fermentation and nitrogen metabolism studied *in vivo* and *in vitro*; b) Apparent total tract digestibility and performance of heifers fed high concentrate diets. We hypothesize that synchronizing energy and protein release from cereal grains and protein sources will improve ruminal fermentation, microbial protein synthesis and animal performance. Moreover, these effects could vary in different ruminal pH conditions, thus in the *in vitro* trial, two different pH were tested: a constant pH of 6.2 and a variable pH, with 12 h at 6.4 and 12 h at 5.8.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *In vivo* trial

#### 2.1.1. Animals, diets and housing

Four female Holstein heifers (17 wk of age;  $132.3 \pm 1.61$  kg BW) fitted with ruminal trocar (i.d. 1 cm, Dibasa Farmavic S. A., Vic, Spain) were used in a 4 x 4 Latin square design with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments. Main factors were NSC

source (barley and corn) and protein source (soybean meal, SBM, and sunflower meal, SFM). Barley has a greater rate of NSC degradability than corn (Herrera-Saldana et al., 1990b; Noceck and Tamminga, 1991; Casper et al., 1999), and SFM has a greater rate of protein degradation and effective degradability in the rumen than SBM (A. Rotger, artículo 2). Barley and SFM were mixed to synchronize rapid fermentation, and corn and SBM to synchronize slow fermentation. Two unsynchronized diets with a rapidly and a slowly fermenting component were formulated by mixing barley with SBM or corn with SFM. From these combinations, four complete isoenergetic (2.8 Mcal/kg DM) and isonitrogenous (14% CP) mixed diets were formulated with a forage to concentrate ratio close to 10:90 (Table 1).

Barley straw, chopped coarsely to approximately 7 cm in length, was the forage source. Diets were formulated to meet requirements for animals growing at 1 kg/d (NRC, 1996). The proportion of total dietary CP supplied by SBM or SFM was 32% in the diets based on barley and 57% in the diets based on corn. Concentrate and straw were manually mixed before feeding once daily (0830).

Heifers were housed in indoor tied stalls, bedded with a rubber mat (2 x 1.4 m) with an individual feed bunk and with free access to feed and water.

The ruminal fistula was performed, under local anesthesia, 3 wk before the beginning of the experiment. The research protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

### **2.1.2. Sample collection and analyses**

The experimental period consisted of 4 periods of 28 d, 14 d for diet adaptation and 14 d for sample collection. Body weight was recorded before feeding on three consecutive days at the beginning and at the end of the trial and on d 1 of each experimental period. Refusals were weighed daily before feeding and the offered ration was 110% of the previous day's intake, in order to ensure ad libitum intake. From d 1 to 3, the new experimental diet was introduced progressively. From d 15 to 19, feed and refusal samples were collected and composited within heifer and period in order to calculate DM and nutrient intake. On d 17, a sample of 500 mL of ruminal contents was collected with a vacuum pump from different locations in the rumen, before the morning feeding and at 2, 4, 8, 12, 16 and 24 h postfeeding, and squeezed through two layers of cheesecloth. After sampling, extra ruminal fluid was returned into the rumen.



**Table 1.** Composition of diets, on DM basis.

	Barley		Corn	
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>
Ingredient composition, % DM				
Barley, ground	76.50	75.50	--	--
Corn, ground	--	--	68.70	65.60
Soybean meal 44	9.00	--	15.80	--
Sunflower meal	--	14.00	--	23.90
Barley straw	12.00	8.00	13.00	8.00
Sodium bicarbonate	0.40	0.40	0.40	0.40
Dicalcium phosphate	0.60	0.60	0.60	0.60
White salt	0.40	0.40	0.40	0.40
Calcium carbonate	0.80	0.80	0.80	0.80
Vitamin/mineral premix <sup>c</sup>	0.30	0.30	0.30	0.30
Calculated nutrient composition				
CP, % DM	14.30	14.20	14.20	14.00
DIP, % CP	64.90	70.30	60.50	69.80
NDF, % DM	24.00	25.00	18.00	21.00
NSC, % DM	55.80	54.40	61.00	57.40
ME, Mcal/kg	2.79	2.76	2.88	2.79

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>Vitamin and mineral premix contained per kg DM: 3,300 kIU vitamin A, 660 kIU vitamin D<sub>3</sub>, 2,100 IU vitamin E, 0.66 g thiamin, 0.66 g riboflavin, 2.2 mg vitamin B<sub>12</sub>, 26 mg choline chloride, 13.4 g Zn, 3.3 g Fe, 83.3 g S, 16.6 g Mn, 16.6 g Mg, 3.3 g Cu, 116.6 mg I, 166.6 mg Co, 66.6 mg Se, 100 mg ethoxyquin, 100 mg butylated hydroxytoluene.

The pH of the ruminal fluid was measured immediately and two subsamples were taken at each time. First, a 4-mL subsample of strained fluid was acidified with 4 mL of 0.2 N HCl and frozen. Samples were later thawed in the refrigerator overnight, centrifuged at 25,000 × g for 20 min, and the supernatant fraction was analyzed for ammonia nitrogen by spectrophotometry (Chaney and Marbach, 1962). Second, 1 mL of a solution made up of 2 g/L mercuric chloride (to impede microbial growth), 20

mL/L orthophosphoric acid, and 2 g/L 4-methylvaleric (internal standard) in distilled water was added to 4 mL of strained ruminal fluid, which was then frozen (Jouany, 1982). Volatile fatty acids were analysed with a polyethylene glycol TPA treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., UK) by gas chromatography using the G1530A (6890) model of the Hewlett Packard gas chromatograph (Hewlett Packard GmbH Chemische Analysetechnik, Waldbronn, Germany).

From d 20 to 28 of each period (6 d adjustment, 3 d sampling), rations were thoroughly mixed with chromic oxide (1 g/kg DM) in order to estimate fecal output and to calculate the apparent total tract digestibility afterwards. Feed, refusal and fecal samples were collected during sampling days. Fecal grab samples (approximately 300 g on a wet weight basis) were collected twice a day (0900 and 1600) and dried at 103°C over 48 h. Chromium content of feed, refusals and feces was determined according to the procedure of Le Du and Penning (1982) by atomic absorption spectrophotometry. For fecal chemical analysis, a portion of fecal samples was composited within heifer and period.

Feed, refusals and fecal samples were analysed for DM (24 h at 103°C) and ash (4 h at 550°C). Nitrogen content was determined using the Kjeldahl method (procedure 976.05 AOAC, 1990) with selenium as catalyst. Neutral detergent fiber content of feed and refusals was determined by Van Soest et al. (1991) with sodium sulfite and heat stable alpha amylase, and expressed without residual ash.

### **2.1.3. Calculations**

Total tract apparent digestibility was calculated as 1 minus the quotient between fecal output and intake. Ruminal fluid pH, ammonia nitrogen and VFA measures postfeeding were averaged across time by calculating the area under the ruminal data vs. time curve and dividing by total time (Pitt and Pell, 1997). The same procedure was used to calculate mean daily hours and area under the curve at pH 5.8 (Nocek et al., 2002). The pH change was calculated as the difference between highest and lowest pH individually for each heifer and period.

### **2.1.4. Statistical analyses**

Data were analyzed using the PROC MIXED procedure (Little et al., 1996) of SAS version 8.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC) for a Latin square design with a 2 x 2 arrangement of treatments. The model accounted for the effect of protein source, NSC

source, the interaction of protein x NSC sources and period as fixed effects. Animal was considered a random effect. Effects were considered significant at  $P \leq 0.05$ . When significant differences were detected, differences among means were tested using Tukey's multiple comparison test.

Ruminal data collected at different times after feeding were analyzed using the PROC MIXED procedure for repeated measures. The model contained the same fixed effects as described before, except that time after feeding and its interaction with main factors were also included. Time after feeding was the repeated factor, and the subject was the interaction of heifer x period, nested within treatment. For each analyzed variable, data was subjected to four covariance structures: variance components, compound symmetric, one-band unstructured and autoregressive of order one. The covariance structure that yielded the smaller Akaike and Schwarz's Bayesian criterion was considered to be the most desirable for analysis.

## **2.2. *In vitro* trial**

### **2.2.1. Apparatus and experimental design**

Eight 1320 mL dual-flow continuous culture fermenters developed by Hoover et al. (1976) were used in 3 consecutive periods to study the effects of protein and NSC sources and pH on microbial fermentation and nutrient flow in a 2 x 2 x 2 factorial arrangement of treatments.

Dietary treatments were the same as *in vivo*, and each diet was tested at constant (6.2) or variable pH (12 h at pH 6.4 and 12 h at pH 5.8). Variable pH was designed to simulate subclinical acidosis frequently associated with high concentrate diets (Beauchemin and Rode, 1997), and Schwartzkopf-Genswein et al. (2003) considered subclinical acidosis when ruminal pH was below 5.8 for 12 h/d. Consequently, eight treatments resulted: 1) Barley-SBM, pH 6.2; 2) Barley-SBM, pH 6.4-5.8; 3) Barley-SFM, pH 6.2; 4) Barley-SFM, pH 6.4-5.8; 5) Corn-SBM; pH 6.2; 6) Corn-SBM; pH 6.4-5.8; 7) Corn-SFM, pH 6.2; 8) Corn-SFM, pH 6.4-5.8. Diets were ground through a 1.5-mm screen (Hammer mill, P. Prats S. A., Sabadell, Spain), and 95 g (DM) were fed daily to each fermenter in three equal portions every 8 h. Temperature was maintained at 39°C, and pH was maintained at the programmed level by infusion of 3 N HCl or 5 N NaOH solutions. Anaerobic conditions were maintained by infusion of N<sub>2</sub> at a rate of 40 mL/min. Fermentation conditions were monitored and controlled by a computer and a Programmable Linear Controller (FieldPoint, National Instruments, Austin, TX).

Artificial saliva (Weller and Pilgrim, 1974) was continuously infused into flasks and contained 0.4 g/L of urea to simulate recycled N. Liquid and solid dilution rates were maintained at 9 and 6 %/h, respectively, similar to values previously observed *in vivo* with heifers fed high concentrate diets (Devant et al., 2001; A. Rotger, artículo 1 y 2).

Fermenters were inoculated with a composited ruminal fluid taken from four ruminally cannulated growing heifers (375 kg BW) fed on an ad libitum basis a high concentrate diet (15.2% CP and 2.75 Mcal/kg DM), containing as main ingredients: 34.0% corn, 40.0% barley, 11.8% soybean meal and 11.8% barley straw.

### 2.2.2. Sample collection and analyses

The experiment consisted of three experimental periods of 8 d (5 d for adaptation and 3 d for sampling). During sampling days, effluent collection vessels were maintained in a 4°C bath. Solid and liquid effluents were mixed and homogenized for 1 min, and a 600-mL sample was obtained by aspiration. At the end of each period, effluent samples from the 3 sampling days were composited and mixed within fermenter, and homogenized for 1 min. Subsamples were taken for total N, ammonia N, and VFA analyses, and analyzed as described for samples obtained *in vivo*. The rest of the sample was lyophilized. Dry samples were analyzed for DM and ash (as described before), and for purine content. Bacteria were isolated from fermenter flasks on the last day of each period. Solid and liquid associated bacteria were isolated using a combination of several detachment procedures (Whitehouse et al., 1994), selected to obtain the maximum detachment without affecting cell integrity. Small marbles (30 of 2 mm and 15 of 4 mm diameter) and a solution made with 0.2 g methyl-cellulose in 100 mL of distilled water were added to each fermenter flask and mixed at 30°C for 1 h to remove attached bacteria. After incubation, fermenter flasks were refrigerated at 4°C for 24 h and subsequently were agitated for 1 h to dislodge loosely attached bacteria. Finally, the fermenter content was filtered through two layers of cheesecloth and washed with saline solution (8.5 g/L NaCl). Bacterial cells were isolated within 4 h by differential centrifugation at 1,000 x g for 10 min to eliminate feed particles, and the supernatant was centrifuged at 20,000 x g for 20 min to isolate the bacterial pellet. Pellets were rinsed twice with saline solution and recentrifuged at 20,000 x g for 20 min. The final pellet was recovered with distilled water to prevent contamination of bacteria with ash. Bacterial cells were lyophilized and analyzed for DM, ash, N and purine contents. Purine content in bacteria and effluent samples was determined by

HPLC (Balcells et al., 1992) using allopurinol as internal standard. Organic matter digestion, and flows of nonammonia, microbial and nonammonia-nonmicrobial N were calculated as described by Stern and Hoover (1990).

### 2.2.3. Statistical analyses

Data were analyzed as a completely randomized block design with a 2 x 2 x 2 arrangement of treatments, using the PROC MIXED procedure (Little et al., 1996) of SAS. The model contained the effect of pH, protein source, NSC source and the interaction of protein x NSC sources as fixed effects. Fermenter and period were considered random effects. Effects were considered significant at  $P \leq 0.05$ . When significant differences were detected, differences among means were tested using the Tukey's multiple comparison test.

## 3. Results and discussion

### 3.1. *In vivo* trial

The objectives of the *in vivo* trial were to examine the effects of synchrony of nutrient release from NSC and CP sources on performance, apparent total tract digestibility and ruminal metabolism. Because interactions between NSC and CP sources were significant for some variables, results are presented per treatment.

Intake of DM and OM were higher ( $P \leq 0.015$ ) when expressed as  $\text{g/kgBW}^{0.75}$ , and tended to be higher ( $P \leq 0.059$ ) when expressed as  $\text{kg/d}$ , for the corn based diets (Table 2). When expressed as  $\text{g/kg BW}^{0.75}$ , a NSC x CP interaction ( $P = 0.07$ ) was detected; SFM reduced intake when combined with barley, and increased it when it was combined with corn. Previous studies with dairy cattle reported higher intake in corn than barley based diets, mainly due to higher palatability of corn (McCarthy et al., 1989; Casper et al., 1994, 1999). Average daily gain ( $1.2 \pm 0.11 \text{ kg/d}$ ) was close to the predicted rate of NRC (1996), with no significant differences due to dietary treatments. Previous studies did not observe an improvement in ADG due to dietary synchrony in lambs with restricted (Richardson et al., 2003) or ad libitum feeding (Witt et al., 1999). Consequently, in our trial feed efficiency was higher for the barley based diets ( $P = 0.005$ ), in agreement with Boss and Bowman (1996a), who reported a 12% higher feed efficiency in steers fed barley-based high concentrate diets than for those fed corn, and

similar to feed efficiency obtained by Casper et al. (1994) with heifers of similar weight and fed a diet with a forage to concentrate ratio of 50:50.

**Table 2.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on intake and apparent total tract digestibility studied *in vivo*.

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>c</sup>		
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>		NSC	CP	NSC x CP
Observations, n	4	4	4	4				
ADG, kg/d	1.20	1.16	1.11	1.29	0.11	0.752	0.251	0.106
Feed efficiency, kg/kg	0.24	0.25	0.21	0.20	0.02	0.018	0.862	0.645
Intake, kg/d								
DM	5.1	4.8	5.4	6.7	0.48	0.059	0.336	0.138
OM	4.8 <sup>v,x</sup>	4.5 <sup>x</sup>	5.1 <sup>v,x</sup>	6.3 <sup>v</sup>	0.45	0.056	0.333	0.138
CP	0.74	0.66	0.73	0.85	0.07	0.239	0.775	0.205
NDF	1.22 <sup>v,x</sup>	1.23 <sup>v,x</sup>	0.99 <sup>x</sup>	1.50 <sup>v</sup>	0.11	0.840	0.052	0.055
NDFF <sup>d</sup>	0.49 <sup>z</sup>	0.34 <sup>y</sup>	0.50 <sup>z</sup>	0.45 <sup>y,z</sup>	0.03	0.083	0.013	0.140
Intake, g/kg BW <sup>0.75</sup>								
DM	101.8 <sup>z</sup>	96.6 <sup>z</sup>	110.8 <sup>y,z</sup>	137.8 <sup>y</sup>	7.50	0.015	0.194	0.074
OM	96.2 <sup>z</sup>	91.5 <sup>z</sup>	105.1 <sup>y,z</sup>	130.7 <sup>y</sup>	7.06	0.014	0.192	0.075
CP	14.7	13.4	15.1	17.3	1.11	0.102	0.691	0.163
NDF	24.6 <sup>y,z</sup>	24.8 <sup>y,z</sup>	20.5 <sup>z</sup>	30.9 <sup>y</sup>	1.89	0.608	0.030	0.035
NDFF <sup>d</sup>	9.9 <sup>z</sup>	6.8 <sup>y</sup>	10.3 <sup>z</sup>	9.2 <sup>z</sup>	0.46	0.022	0.004	0.082
Apparent total tract digestibility, %								
DM	61.9	65.4	67.9	63.5	2.92	0.515	0.877	0.222
OM	63.0	65.2	68.4	63.6	3.05	0.556	0.684	0.296
CP	62.0	64.7	64.1	61.6	3.38	0.891	0.981	0.512

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect.

<sup>d</sup>NDFF = NDF from forage.

<sup>y-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>v-x</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.10$ ).

Despite the difference in DM and OM intake among diets, no differences were detected in CP intake due to lower than formulated CP content of the corn based diets (13.1% vs. 14.1% for analyzed and formulated CP content of corn based diets, respectively). Neutral detergent fiber intake was higher for the SFM diet ( $P \leq 0.052$ ) when corn was the NSC source, but not when combined with barley (NSC x CP interaction,  $P \leq 0.055$ ). Inversely, intake of NDF from forage (NDF<sub>F</sub>) was higher ( $P \leq 0.013$ ) when SBM was the protein source. Because SFM has higher NDF content than SBM, a higher straw content was incorporated in SBM based diets.

Apparent total tract digestibility of DM, OM and CP did not differ among treatments (Table 2). Values of apparent total tract digestibility were slightly lower than values obtained by Herrera-Saldana et al. (1990a) with dairy cattle fed a 35:65 forage to concentrate diet. Boss and Bowman (1996a) and Surber and Bowman (1998) reported higher total tract DM and OM digestibility for barley than corn based diets fed to steers. However, McCarthy et al. (1989) and Khorasani et al. (2001) did not observe differences in apparent total tract digestibility in dairy cows, arguing that the lower ruminal degradability of corn starch could be compensated with a higher postruminal digestion.

No differences were detected among treatments for average ruminal pH ( $6.5 \pm 0.14$ ; Table 3) and its daily postprandial evolution (NSC x CP x time  $P = 0.32$ ; Figure 1a). The time pH was below 5.8 was not affected by NSC or protein source, and decreases in ruminal pH below 6 for less than 4 hours may have negligible effects on ruminal fermentation (Sauvant et al., 1999). Khorasani et al. (2001) observed that average pH was not affected by the grain source, but the rate of decrease in pH postfeeding was faster for cows fed barley than for cows fed corn. In barley based diets, highest pH was higher ( $P = 0.041$ ) when combined with SBM and pH change tended to be higher for the desynchronized diets ( $P = 0.10$ ).

Ruminal NH<sub>3</sub> N concentration (Table 3) tended to be lower ( $P = 0.075$ ) for corn based diets and below the level referred to maximize microbial protein synthesis (5 mg/100 mL; Satter and Slyter, 1974). A time after feeding x NSC x CP interaction was detected for postprandial evolution of NH<sub>3</sub> N ( $P < 0.001$ ; Figure 1c), as a result of higher prefeeding values and greater diurnal fluctuation for the barley than corn based diets. Most studies in dairy cattle reported lower NH<sub>3</sub> N concentration in barley than corn based diets, mainly due to the greater rate of NSC degradability of barley and the greater incorporation of NH<sub>3</sub> N into microbial protein synthesis (McCarthy et al., 1989;

Casper et al., 1990, 1999). In contrast, Surber and Bowman (1998) reported higher ruminal  $\text{NH}_3\text{N}$  concentration for steers fed barley than for steers fed corn.

**Table 3.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on ruminal fermentation studied *in vivo*.

Item	Barley		Corn		SEM	<i>P</i> -value <sup>c</sup>		
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>		NSC	CP	NSC x CP
Observations, n	4	4	4	4				
pH								
Average	6.50	6.50	6.56	6.59	0.14	0.592	0.929	0.907
Lowest	5.67	5.88	6.09	5.86	0.18	0.305	0.960	0.252
Highest	7.81 <sup>x</sup>	7.39 <sup>v</sup>	7.47 <sup>v,x</sup>	7.43 <sup>v</sup>	0.13	0.124	0.041	0.074
pH change (highest-lowest)	2.14	1.51	1.38	1.57	0.27	0.147	0.338	0.100
MDH <sup>d</sup> pH < 5.8, h	4.3	2.5	0.28	2.7	2.18	0.406	0.890	0.364
AUC <sup>e</sup> pH < 5.8	24.6	14.3	1.6	15.3	12.34	0.406	0.894	0.364
$\text{NH}_3\text{N}$ , mg/100 mL	4.7	5.5	3.3	2.2	1.11	0.075	0.880	0.408
Total VFA, mM	122.5	115.0	118.3	109.9	4.92	0.384	0.158	0.935
VFA, mol/100 mol								
Acetate	53.4	51.5	53.6	55.5	2.61	0.369	0.999	0.403
Propionate	32.3	37.2	31.6	29.1	4.73	0.320	0.774	0.399
Butyrate	7.7	6.3	8.9	7.9	1.36	0.309	0.404	0.860
Isobutyrate	0.96	1.12	1.09	1.23	0.18	0.522	0.430	0.988
Valerate	2.44 <sup>z</sup>	1.92 <sup>y,z</sup>	1.62 <sup>y</sup>	1.64 <sup>y</sup>	0.27	0.009	0.135	0.106
Isovalerate	3.2	2.0	3.2	4.6	1.34	0.298	0.967	0.316
Acetate:Propionate	1.8	1.4	1.9	3.2	0.76	0.261	0.582	0.278

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect.

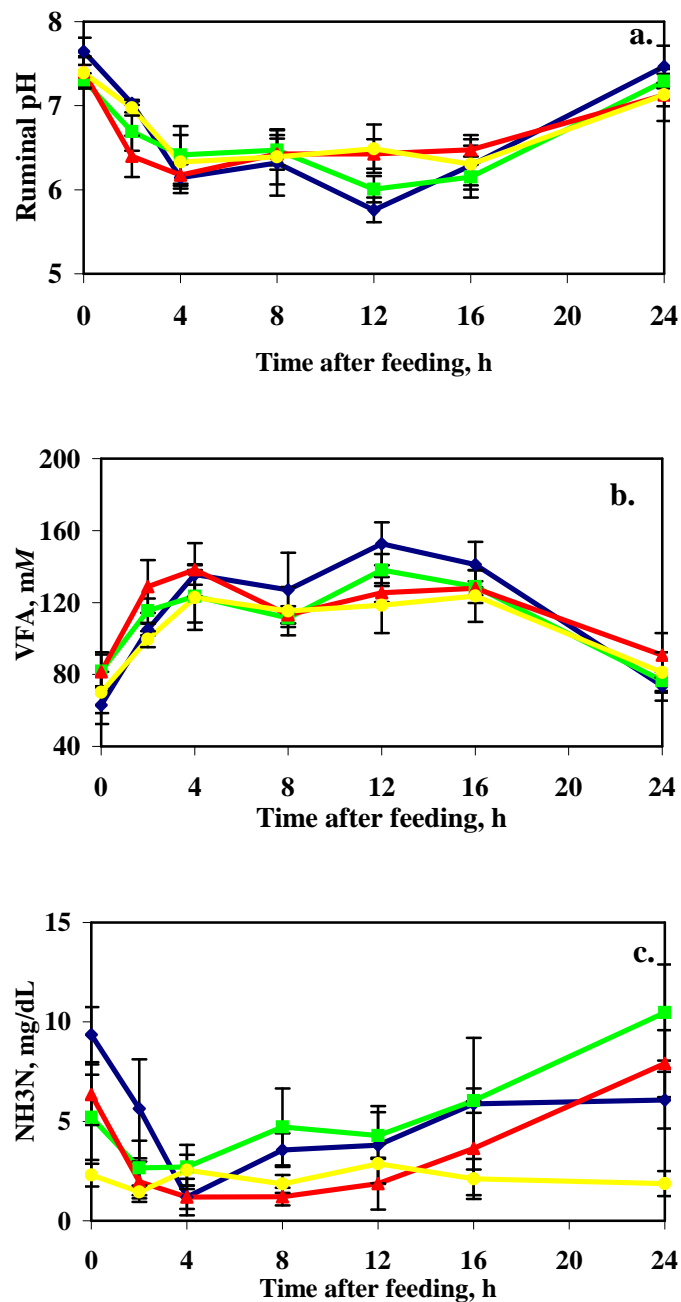
<sup>d</sup>MDH pH < 5.8 = mean daily hours at pH < 5.8.

<sup>e</sup>AUC pH < 5.8 = area under the curve at pH < 5.8.

<sup>y-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>v,x</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.10$ ).





**Figure 1.** Ruminal pH (a), total VFA concentration (b) and concentration of ruminal ammonia nitrogen (c) with time after feeding in dietary treatments. Diets are: Barley-SBM, blue; Barley-SFM, green; Corn-SBM, red; Corn-SFM, yellow. Diet x time after feeding interactions were  $P = 0.316$  for ruminal pH;  $P = 860$  for total VFA concentration and  $P < 0.001$  for ammonia nitrogen concentration.

Total VFA concentration (average of  $116.4 \pm 4.92$  mM) was in accordance with Rotger et al. (2005) for heifers of a similar age and fed high concentrate diets. Total VFA concentration and postprandrial evolution (Figure 1b) were not affected by NSC or protein source (Table 3). Most research studies with dairy cattle reported a higher VFA concentration in barley based diets, due to the greater rate of NSC degradability of barley (McCarthy et al., 1989; Khorasani et al., 2001); other studies reported no differences between barley and corn based diets (Casper and Schingoethe, 1989) or higher VFA concentration for corn based diets (Casper et al., 1999). Surber and Bowman (1998) with beef cattle reported a higher VFA concentration in barley based diets. Molar proportions of individual VFA were not affected by NSC or protein source (Table 3), in agreement with Casper et al. (1999). Other studies with dairy cattle observed a higher concentration of propionate in barley based diets, possibly because of a higher degradation of starch in these diets (Casper and Schingoethe, 1989; McCarthy et al., 1989). Molar proportion of valerate was higher for the barley based diets ( $P = 0.009$ ), in agreement with Surber and Bowman (1998).

### 3.2. *In vitro* trial

The *in vitro* trial was designed to evaluate the effects of NSC and protein sources on microbial fermentation and nutrient flow maintained at a constant pH of 6.2 or 12 h at pH of 6.4 and 12 h at pH of 5.8, simulating subclinical acidosis. Significant interactions were found between NSC and protein sources, in disagreement with some *in vitro* (Newbold and Rust, 1992; Mansfield et al., 1994) and *in vivo* (Henning et al., 1993) studies which reported that ruminal fermentation was controlled by either availability of energy or protein and not by the interaction of these two nutrients.

True OM digestibility tended to be higher (NSC x CP interaction  $P = 0.072$ ) for synchronized (barley-SFM and corn-SBM) than unsynchronized diets (barley-SBM and corn-SFM) (Table 4). Although it is widely known that barley has a higher extent of ruminal degradation (Herrera-Saldana et al., 1990b; Nocek and Russell, 1988), some *in vivo* studies with steers fed high concentrate diets based on barley or corn, have failed to detect these differences in OM digestibility (Spicer et al., 1986; Surber and Bowman, 1998) or have observed a higher ruminal OM digestibility in corn based diets (Boss and Bowman, 1996b).

**Table 4.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on ruminal OM digestibility and N metabolism studied *in vitro*.

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>c</sup>			pH
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>		NSC	CP	NSC x CP	
Observations, n <sup>d</sup>	4	4	4	4					
True OM digestibility <sup>e</sup> , %	54.1	57.8	57.0	51.8	1.93	0.413	0.702	0.072	0.770
N metabolism									
NH <sub>3</sub> N, mg/100 mL	1.15	1.18	0.50	0.49	0.10	0.006	0.908	0.811	0.272
N flow, g/d									
NAN <sup>f</sup>	2.43 <sup>y,z</sup>	2.32 <sup>z</sup>	2.54 <sup>y</sup>	2.31 <sup>z</sup>	0.04	0.192	0.015	0.125	0.938
Microbial N	1.86	2.18	1.89	1.63	0.15	0.116	0.816	0.092	0.326
NANMN <sup>g</sup>	0.59	0.15	0.63	0.66	0.17	0.111	0.216	0.150	0.354
EMPS <sup>h</sup>	38.28	41.81	34.39	34.44	2.13	0.077	0.461	0.269	0.473

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect; pH = pH effect.

<sup>d</sup>n = 4 instead of 6, due to accidental lost of bacterial pellet from period 2.

<sup>e</sup>Total OM flow corrected for microbial OM flow.

<sup>f</sup>Nonammonia N.

<sup>g</sup>Nonammonia-nonmicrobial N.

<sup>h</sup>EMPS: Efficiency of microbial protein synthesis, g bacterial N/kg of OM truly digested.

<sup>y-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Effluent NH<sub>3</sub> N concentration (Table 4) was lower ( $P = 0.006$ ) in corn based diets, in agreement with the *in vivo* trial. However, while in the *in vivo* trial, the slightly lower CP content of corn based diets could not have been the cause of the lower NH<sub>3</sub> N concentration, as it was compensated by a higher intake, it could be a valid argument in the *in vitro* trial, where all diets had the same intake. The low NH<sub>3</sub> N concentrations observed in corn based diets did not seem to impair ruminal degradation of OM or microbial protein synthesis (Table 4). The high availability of energy from NSC may allow the incorporation of peptides and preformed amino acids into microbial cells, reducing the NH<sub>3</sub> N ruminal concentration without limiting microbial fermentation (Russell et al., 1983; Van Kessel and Russell, 1996; Russell, 1998). Barley protein is

more degradable than corn protein (Spicer et al., 1986; Herrera-Saldana et al., 1990b) and it would explain the higher  $\text{NH}_3$  N concentration in barley based diets. Nonammonia N was higher ( $P = 0.015$ ) when SBM was the protein source. A NSC x CP interaction ( $P = 0.092$ ) was detected for microbial protein flow (Table 4). Within each NSC source, microbial N tended to be higher in the synchronized diet. There is general agreement that energy source is the main factor determining microbial protein synthesis (Hoover and Stokes, 1991; Henning et al., 1993). Previous studies observed a higher flow of microbial N to the duodenum for barley than for corn based diets fed to dairy cows (McCarthy et al., 1989) or to steers (Spicer et al., 1986; Boss and Bowman, 1996b; Surber and Bowman, 1998). However, there is some disagreement whether synchronization between energy and protein sources would improve microbial growth. Some *in vivo* studies reported higher microbial protein synthesis for synchronized diets (Herrera-Saldana et al., 1990a; Casper et al., 1999) and others found no effect of synchronization (Henning et al., 1993; Mansfield et al., 1994; Richardson et al., 2003), concluding that ruminal fermentation may be limited by protein or energy availability rather than by lack of synchronization of release of these nutrients. Different NSC and protein sources may confound the effects of synchronization.

Efficiency of microbial protein synthesis, expressed as grams of microbial N per kilogram of OM truly digested in the rumen, tended to be greater ( $P = 0.077$ ) when barley was the NSC source, in agreement with results reported by Boss and Bowman (1996b) with beef cattle. However, the present values were higher than those reviewed by Oldham (1984) for dairy cows. The high incorporation of peptides and preformed amino acids into microbial protein, in high concentrate diets, may increase the efficiency of microbial protein synthesis (Russell, 1998).

Similarly to true OM digestibility, a NSC x CP interaction ( $P = 0.067$ ) was detected for total VFA concentration (Table 5), being higher for synchronized (barley-SFM and corn-SBM) than unsynchronized diets (barley-SBM and corn-SFM). Molar proportion of acetate tended to be higher ( $P = 0.055$ ) and molar proportion of propionate tended to be lower ( $P = 0.068$ ) in barley based diets. Consequently, the acetate:propionate ratio was higher ( $P = 0.029$ ) in barley based diets. The higher NDF content of the barley based diet may increase acetate production. *In vivo*, differences in intake balanced gross NDF intake and differences in VFA concentrations were not detected. Surber and Bowman (1998) and Boss and Bowman (1996b) with steers limit fed high concentrate diets based on barley or corn, also reported a higher

acetate:propionate ratio for barley based diets. Molar proportion of valerate was affected by the protein source and was higher ( $P = 0.042$ ) in SBM based diets.

**Table 5.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on total concentration and relative proportions of volatile fatty acids studied *in vitro*.

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>c</sup>			pH
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>		NSC	CP	NSC x CP	
Observations, n	6	6	6	6					
Total VFA, mM	145.5	149.3	155.3	146.1	4.36	0.356	0.472	0.067	0.396
VFA, mol/100 mol									
Acetate	49.0 <sup>z</sup>	46.1 <sup>y,z</sup>	41.7 <sup>y</sup>	42.4 <sup>y,z</sup>	2.15	0.055	0.702	0.361	0.848
Propionate	39.3	42.9	45.1	45.4	2.4	0.068	0.365	0.406	0.896
Butyrate	8.26	6.84	8.98	8.54	0.99	0.165	0.286	0.549	0.957
Isobutyrate	0.42	0.44	0.45	0.43	0.04	0.698	0.820	0.531	0.565
Valerate	3.19	2.67	2.95	2.50	0.42	0.334	0.042	0.881	0.604
Isovalerate	0.87	1.01	0.81	0.78	0.12	0.237	0.659	0.492	0.873
Acetate:Propionate	1.29 <sup>x</sup>	1.10 <sup>v,x</sup>	0.92 <sup>v</sup>	0.95 <sup>v,x</sup>	0.13	0.029	0.482	0.273	0.964

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect; pH = pH effect.

<sup>y-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>v-x</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.10$ ).

The fluctuation of pH studied *in vitro* intended to simulate subclinical acidosis frequently observed in feedlot cattle fed high concentrate diets (Owens et al., 1998), even though it was not detected in the *in vivo* trial. Ruminal OM digestibility, microbial fermentation and N metabolism were not affected by the simulated ruminal subclinical acidosis. In agreement with Calsamiglia et al. (2002) pH could be reduced from 6.4 to 5.8 for 12 h a day with small effects on ruminal fermentation and microbial protein synthesis. Continuous pH of 5.8 for 12 h a day may not be critical for amilolytic bacteria.

In summary, synchronization of NSC and protein sources for rapid or slow fermentation tended to result in higher OM digestion, VFA production and flow of

microbial N in a double flow continuous culture, but *in vivo*, synchronization had no effect on ruminal fermentation or on performance. Recycling of endogenous N or intake differences could mask the effects of synchronization observed *in vitro*. The low ruminal ammonia N concentration observed *in vivo* and *in vitro* did not seem to impair ruminal fermentation, possibly because in high concentrate diets there may be a high incorporation of peptides and preformed amino acids directly into microbial protein synthesis. Fluctuation of pH of 12 h at 5.8 had no effect on ruminal fermentation or microbial protein synthesis, as it may not be critical for amilolytic bacteria. Barley based diets resulted in a better feed conversion *in vivo* and in a higher efficiency of microbial synthesis, estimated *in vitro*.

#### 4. Literature cited

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Balcells, J., J. A. Guada, and J. M. Peiró. 1992. Short communication: Simultaneous determination of allantoin and oxypurines in biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 575:153-157.
- Beauchemin, K. A., and L. M. Rode. 1997. Minimum versus optimum concentrations of fiber in dairy cow diets based on barley silage and concentrates of barley or corn. *J. Dairy Sci.* 80:1629-1639.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. 2001. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. *J. Anim. Sci.* 79:1925-1936.
- Boss, D. L., and J. G. P. Bowman. 1996a. Barley varieties for finishing steers: I. Feedlot performance, *in vivo* diet digestion, and carcass characteristics. *J. Anim. Sci.* 74:1967-1972.
- Boss, D. L., and J. G. P. Bowman. 1996b. Barley varieties for finishing steers: II. Ruminal characteristics and rate, site, and extent of digestion. *J. Anim. Sci.* 74:1973-1981.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, and M. Devant. 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.

- Casper, D. P., and D. J. Schingoethe. 1989. Lactational response of dairy cows to diets varying in ruminal solubilities of carbohydrate and crude protein. *J. Dairy Sci.* 72:928-941.
- Casper, D. P., D. J. Schingoethe, and W. A. Eisenbeisz. 1990. Response of early lactation dairy cows fed diets varying in source of nonstructural carbohydrate and crude protein. *J. Dairy Sci.* 73:1039-1050.
- Casper, D. P., D. J. Schingoethe, M. J. Brouk, and H. A. Maiga. 1994. Nonstructural carbohydrate and undegraded protein sources in the diet: growth responses of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 77:2595-2604.
- Casper, D. P., H. A. Maiga, M. J. Brouk, and J. Schingoethe. 1999. Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1779-1790.
- Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132.
- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953.
- Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *J. Anim. Sci.* 71:2516-2528.
- Herrera-Saldana, R., R. Gomez-Alarcon, M. Torabi, and J. T. Huber. 1990a. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142-148.
- Herrera-Saldana, R., J. T. Huber, and M. H. Poore. 1990b. Dry matter, crude protein and starch degradability of five cereals grains. *J. Dairy Sci.* 73:2386-2393.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
- Hoover, W. H., and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630-3644.

- Hoover, W. H., B. A. Crooker, and C. J. Sniffen. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen content. *J. Anim. Sci.* 43:528-534.
- Jouany, J. P. 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermentor contents. *Sci. Aliment.* 2:131-144.
- Khorasani, G. R., E. K. Okine, and J. J. Kennelly. 2001. Effects of substituting barley grain with corn on ruminal fermentation characteristics, milk yield, and milk composition of holstein cows. *J. Dairy Sci.* 84:2760-2769.
- Le Du, Y. L. P., and P. D. Penning. 1982. Animal based techniques for estimating herbage intake. Pages 37-75 in *Herbage Intake Handbook*. J. D. Leaver, ed. Grassland Res. Inst., Hurley, UK.
- Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D. Wolfinger. 1996. *SAS System for Mixed Models*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Mansfield, H. R., M. I. Endres, and M. D. Stern. 1994. Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 72:2464-2474.
- McCarthy, R. D. Jr., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, and J. H. Clark. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
- Newbold, J. R., and S. R. Rust. 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Animal Sci.* 70: 538-546.
- Nocek, J. E., and J. B. Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.* 71:2070-2107.
- Nocek, J. E., and S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and J. G. Allman. 2002. Ruminal supplementation of direct fed microbials on diurnal pH variation and in situ digestion in dairy cattle. *J. Dairy Sci* 85:429-433.
- NRC. 1996. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.



- Oldham, J. D. 1984. Protein-energy interrelationships in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:1090-1114.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, and D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Pitt, R. E., and A. N. Pell. 1997. Modeling ruminal pH fluctuations: Interactions between meal frequency and digestion rate. *J. Dairy Sci.* 80:2429-2441.
- Richardson, J. M., R. G. Wilkinson, and L. A. Sinclair. 2003. Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth and metabolism of lambs. *J. Anim. Sci.* 81:1332-1347.
- Rotger, A., A. Ferret, S. Calsamiglia, and X. Manteca. 2005. Changes in ruminal fermentation and protein degradation in growing Holstein heifers from 80 to 250 kg fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio. *J. Anim. Sci.* 83 (*in press*).
- Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763-775.
- Satter, L. D., and L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Sauvant, D., F. Meschy, and D. Mertens. 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Prod. Anim.* 12:49-60.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, and T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E149-E158.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., and W. V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Spicer, L. A., C. B. Theurer, J. Sowe, and T. H. Noon. 1986. Ruminal and postruminal utilization of nitrogen and starch from sorghum grain-, corn- and barley-based diets by beef steers. *J. Anim. Sci.* 62:521-530.

- Stern, M. D., and H. W. Hoover. 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17-32 in Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or fermentation. Northwest ADSA-ASAS Regional meeting, Chazy, NY.
- Strobel, H. J., and J. B. Russell. 1986. Effect of pH and energy spilling on bacteria protein synthesis by carbohydrate limited cultures of rumen mixed bacteria. *J. Dairy Sci.* 69:2941-2949.
- Surber, L. M. M., and J. G. P. Bowman. 1998. Monensin effects on digestion of corn or barley high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 76:1945-1954.
- Van Kessel, J. S., and J. B. Russel. 1996. The effect of amino nitrogen on energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. *J. Dairy Sci.* 79:1237-1243.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3588-3597.
- Weller, R. A., and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. *Br. J. Nutr.* 32:341-351.
- Whitehouse, N. L., V. M. Olson, C. G. Schawb, W. R. Chesbro, K. D. Cunningham, and K. D. Lycos. 1994. Improved techniques for dissociating particle-associated mixed ruminal microorganisms from ruminal digesta solids. *J. Anim. Sci.* 72:1335-1343.
- Witt, M. W., L. A. Sinclair, R. G. Wilkinson, and P. J. Buttery. 1999. The effects of synchronizing the rate of dietary energy and nitrogen supply to the rumen on the production and metabolism of sheep: Food characterization and growth and metabolism of ewe lambs given food ad libitum. *Anim. Sci.* 69:223-235.

## **ARTÍCULO 4**

**Efectos de las fuentes de carbohidratos no estructurales y de proteína sobre el comportamiento de ingestión de terneras atadas y alimentadas con dietas concentradas**

**Effects of dietary nonstructural carbohydrates and protein sources on feeding behavior of tethered heifers fed high concentrate diets.****Abstract**

Four rumen fistulated Holstein heifers (BW  $132.3 \pm 1.61$  kg) were assigned to a 4 x 4 Latin square design with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments to describe feeding behavior of growing heifers fed high concentrate diets with different sources of nonstructural carbohydrates (NSC) and protein, in order to explain the ruminal fermentation pattern. Two NSC sources (barley and corn) and two protein sources (soybean meal, SBM, and sunflower meal, SFM) differing in their rate and extent of ruminal degradation were combined resulting in a synchronized rapid fermentation diet (barley-SFM); a synchronized slow fermentation diet (corn-SBM) and two unsynchronized diets with a rapidly and a slowly fermenting component (barley-SBM and corn-SFM). The unsynchronized diet corn-SFM resulted in lower frequency of feeding ( $P \leq 0.05$ ), longer meal length ( $P \leq 0.043$ ) and larger meal size ( $P \leq 0.037$ ). Dietary treatment had no effect on daily percentages of posture and behaviors ( $P \geq 0.086$ ). In general, heifers spent  $9.97 \pm 0.83$  % of the day eating,  $2.11 \pm 0.42$  % drinking,  $25.13 \pm 1.36$  % ruminating,  $16.97 \pm 1.42$  % doing other activities such as social behavior and self-grooming, and the rest of the day ( $45.82 \pm 2.55$  %) resting or doing non-chewing activities. Eating, drinking and social behaviors were performed while standing ( $P \leq 0.01$ ) and resting and ruminating mainly while lying ( $P = 0.001$ ). Eating took place mainly in the first 4 h postfeeding ( $P = 0.001$ ), in response to feed delivery, and resting and ruminating mainly at night ( $P = 0.001$ ). When chewing activities (eating and ruminating) were expressed per kg of DM or NDF from forage (NDFFF) intake, more time ( $P = 0.004$ ) was spent chewing per kg of DMI for barley based diets, and for kg of NDFFF intake for barley ( $P = 0.01$ ) and SFM ( $P = 0.002$ ) based diets. Tethered heifers fed the more fermentable and rapidly synchronized diet (Barley-SFM) could avoid acidosis by reducing intake and increasing chewing time. In these high concentrate diets, time spent chewing was not positively related to forage intake. Effectiveness of forage increased when forage intake was low.

**Key words:** Feeding behavior, high concentrate, growing cattle

## 1. Introduction

Feedstuffs have different ruminal degradation rates of carbohydrates and protein, being the main factor controlling the availability of energy and nitrogen compounds for microbial growth (Hoover and Stokes, 1991). Synchrony of release of these nutrients can enhance ruminal fermentation and microbial protein synthesis (Herrera-Saldana et al., 1990).

High concentrate diets promote extensive ruminal fermentation with high rates of VFA production (Allen, 1997). This high rate of VFA production, together with the low buffering capacity of ruminal digesta, increases the risk of ruminal acidosis in high concentrate fed ruminants (Albright, 1993; Beauchemin and Rode, 1997). The low buffering capacity of ruminal digesta is due to the fact that concentrates are easily swallowed and would be less masticated and less saliva would be secreted. However, recent reports with growing heifers fed high concentrate diets have shown no signs of ruminal acidosis (Devant et al., 2000, 2001; Rotger et al., 2005).

Recently, feeding behavior has received considerable attention in ruminant nutrition research (Beauchemin, 1991b; Dado and Allen, 1993; Nielsen, 1999). Daily intake can be achieved by different combinations of meal frequencies, meal sizes and feeding rates that may be determined by diet characteristics such as nutrient composition, physical properties or palatability (Dado and Allen, 1993). Different feeding behavior strategies in growing heifers fed high concentrate diets may determine the pattern of fermentation and may prevent ruminal acidosis.

The objective of this work was to describe feeding behavior of tethered growing heifers fed high concentrate diets with different sources of nonstructural carbohydrates (NSC) and protein, in order to explain the fermentation pattern reported elsewhere (A. Rotger, artículo 3).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals, diets and housing

Four female Holstein heifers (17 wk of age;  $132.3 \pm 1.61$  kg) fitted with ruminal trocar (i.d. 1 cm, Dibasa Farmavic S. A., Vic, Spain) were used in a 4 x 4 Latin square design with a 2 x 2 factorial arrangement of treatments. One of two energy sources, corn and barley, with low and high ruminal degradability were combined with one of two protein sources, soybean meal (SBM) and sunflower meal (SFM), also with low and high ruminal degradability. Barley and SFM were mixed to synchronize rapid

fermentation, and corn and SBM to synchronize slow fermentation. Two unsynchronized diets with a rapidly and a slowly fermenting component were formulated by mixing barley with SBM or corn with SFM. From these combinations, four complete isoenergetic (2.8 Mcal/kg DM) and isonitrogenous (14% CP) mixed diets were formulated with a forage to concentrate ratio close to 10:90. Barley straw, chopped coarsely to approximately 7 cm in length, was the forage source. Detailed formulation and chemical composition of experimental diets have been presented elsewhere by A. Rotger (artículo 3). Concentrate and straw were manually mixed once daily before feeding (0830), and offered on an ad libitum basis. Heifers were housed in indoor tied stalls, bedded with a rubber mat (2 x 1.4 m) with an individual feed bunk and with free access to feed and water. Individual feed bunks (0.9 m x 0.8 m) made of stainless steel (Afora, S.A., Barcelona) were placed on a waterproof digital platform scale (HW-60KV-WP; A&D Company, Limited; Japan) which was fixed to the floor and linked to a computer with a software application to download weight data (WinCP, A&D Company, Limited; Japan). The scales had a weighing capacity of 60 kg and a minimum of 5 g.

The ruminal fistula was performed under local anesthesia 3 wk before the beginning of the experiment. The research protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universitat Autònoma de Barcelona.

## **2.2. Data collection**

The experiment started in December and consisted of 4 periods of 28 d, 14 d for diet adaptation and 14 d for data collection. From d 1 to 3, the new treatment diet was introduced progressively. From d 15 to 19, individual feed weight was recorded continuously (at 1-min interval) for 23.5 h/d by the scales, and feed and refusal samples were collected and composited, for each heifer, in order to calculate intake. Weight data had to meet two criteria to be considered as eating: the animal was touching the feed-bunk (the scale recorded an unstable data) and the feed weight was reduced by more than 10 g in the subsequent stable record. Thirty min were required to remove refusals and clean the feed bunks and the scales. On d 15, 17 and 19, heifers were video recorded simultaneously for 24 h, with continuous lighting. The recording system consisted of a camera (Philips LTC 0500/50) with a focal length of 7.5-75 mm (Philips, LTC 3274/49) located on the ceiling at approximately 3 m in front of the heifers and protected with a carcass (Philips TC9346A), a time lapse recorder (Philips RT24A5T)

and a black and white monitor TV (LTC 2017/50). From each 24 h video recording, the body posture and behavior of individual heifers were recorded instantaneously at 5 min intervals (time sampling). The behavioral categories used were mutually exclusive and are defined in Table 1. The presence of stereotypes, defined by Redbo and Nordblad (1997) as simple movements repeated in the same way over and over again, with no function in the context they are performed, was also recorded. Additional data on ruminal fermentation, apparent total tract digestibility and animal performance were also collected (A. Rotger, artículo 3).

**Table 1.** Description of the postural and the behavioral categories recorded.

<i>Posture</i>	<i>Definition</i>
Standing	Body supported by all four legs, independent of any activity the animal might perform or whether the animal is passive
Lying	Total lying, independent of any activity the animal might perform or whether the animal is passive
Right laterality	Lying on right side
Left laterality	Lying on left side
 <i>Behavior</i>	
Eating	Feeding from the feed bunk with muzzle in the feed or chewing or swallowing food with head raised over the feed bunk
Drinking	Drinking from the drinking trough
Ruminating	Chewing regurgitated feed
Resting	No chewing behavior and no apparent activity or sleeping
Self-grooming	Non-stereotyped licking of own body or scratching with a hind limb or against the fixtures
Social behaviors	Licking or nosing on a neighboring heifer, with the muzzle
Licking/Biting fixtures	Non-stereotyped licking or biting on fixtures
Observing	Being alert, listening and looking towards any sounds or movements
Oral stereotypes	Tongue-rolling, stereotyped licking or biting on certain bars or sites in the stall

### 2.3. Calculations

Meal criterion (longest non-feeding interval accepted as part of a meal) was performed within heifer and period, using log-survivorship curves (Metz, 1975).

Frequency was plotted as percentages of all intervals cumulatively and backward on a log scale for each inter-meal interval length (min) (Dado and Allen, 1993). Changes in the slope of the curve indicated the change in intra-meal and inter-meal intervals. The left side of the curve was adjusted to a polynomial order two, whereas the right side of the curve was adjusted to a regression line. The interception between both lines represents the meal criterion (Labroue et al., 1994). The calculated meal criteria were used to calculate meal frequency (meals/d); meal length (min/meal) from the first eating recorded until, but not including, an inter-meal interval that exceeded the criterion; meal size (g as fed/meal) and eating rate (g as fed/min).

Daily percentages of each behavior and posture were determined by summing the number of times the activity was observed and dividing by the total number of observations that were made for each heifer within period and treatment (4,320 observations). These proportions were square root-arcsine transformed to achieve normal distribution for statistical analysis (Mitlöhner et al., 2001).

Time spent eating and ruminating per kg of DM and NDF from forage (NDFE) intake was calculated assuming that the activity persisted for the entire 5-min period previous to the observation. Total time spent chewing was calculated adding eating and ruminating time for each heifer and period.

#### **2.4. Statistical analyses**

Data were analyzed using the PROC MIXED procedure (Little et al., 1996) of SAS version 8.2 (SAS Inst. Inc., Cary, NC) for a Latin square design with a 2 x 2 arrangement of treatments. The model contained the effect of protein source, NSC source, the interaction of protein x NSC source and period as fixed effects. Heifer was considered a random effect. Effects were considered significant at  $P \leq 0.05$ . When significant differences were detected, differences among means were tested using the Tukey multiple comparison test.

A *t*-test was used to analyze the difference between the time spent standing or lying, and between the time spent lying on the right side or on the left side.

Percentage of time spent on each posture and performing each behavior activity, number of meals and meal size were calculated in 4 time periods postfeeding (0-4 h, 4-8 h, 8-12 h, 12-24h) and the effect of period postfeeding on each variable was tested with the same model described before, including period postfeeding as fixed effect. The



effect of animal posture on behavior activities was analyzed as the effect of period postfeeding.

### 3. Results and discussion

Results of ruminal fermentation, apparent total tract digestibility and animal performance are presented in A. Rotger (artículo 3). Dry matter intake tended to be higher ( $P = 0.059$ ) for corn based diets (Table 2), in agreement with McCarthy et al. (1989) and Casper et al. (1994, 1999), probably due to the higher palatability of corn than barley. Intake NDF was higher ( $P = 0.013$ ) when SBM was the protein source because SBM based diets had a higher straw content.

**Table 2.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on intake and feeding behavior.

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>c</sup>		
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>		NSC	CP	NSC x CP
Observations, n	4	4	4	4				
Intake, g/d								
DM	5087.5	4767.5	5380.0	6702.5	479.8	0.059	0.336	0.138
NDF <sup>d</sup> , % DM	490.5 <sup>z</sup>	336.8 <sup>y</sup>	501.8 <sup>z</sup>	449.0 <sup>y,z</sup>	29.7	0.083	0.013	0.140
No. meals/d	9.92 <sup>y</sup>	12.86 <sup>y</sup>	9.13 <sup>y</sup>	4.50 <sup>z</sup>	1.10	0.004	0.438	0.010
Meal criterion, min	24.50 <sup>y</sup>	18.00 <sup>y</sup>	33.50 <sup>y</sup>	72.75 <sup>z</sup>	6.53	0.003	0.046	0.013
Meal length, min	25.42 <sup>y</sup>	16.71 <sup>y</sup>	31.13 <sup>y</sup>	148.81 <sup>z</sup>	23.73	0.025	0.057	0.034
Meal size, g as fed/meal	583.1 <sup>y</sup>	415.6 <sup>y</sup>	714.6 <sup>y</sup>	1922.2 <sup>z</sup>	230.4	0.012	0.064	0.024
Eating rate, g as fed/min	25.23 <sup>v,x</sup>	26.82 <sup>v</sup>	24.97 <sup>v,x</sup>	19.18 <sup>x</sup>	2.04	0.058	0.258	0.071

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect.

<sup>d</sup>NDF: NDF from forage.

<sup>y-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

<sup>v-x</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.10$ ).

Animals typically divide their daily intake into discrete meals separated by non-feeding intervals (Forbes, 1995). Identifying which intervals are between or within meals can be problematic, as daily number and length of meals depend greatly on the

chosen size of meal criterion. Meal criterion estimates will depend on the type of animal, the type of feed, the management system, and mainly by the way meal criterion is estimated. A consistent definition of meal criterion is not available (Grant and Albright, 1995), and some criteria have been selected on an arbitrary basis (Vasilatos and Wangsness, 1980; Cooper et al., 1999; Erickson et al., 2003). In this trial, meal criterion was estimated by individual survivorship curves for each heifer an period. DeVries et al. (2003) recommended using individual criterion when dietary treatment can affect measures based on the criterion, as is the case here. Meal criterion was longer ( $P \leq 0.021$ ) for the corn-SFM diet, which had less ( $P \leq 0.05$ ) meals per day of longer length ( $P \leq 0.043$ ) and larger size ( $P \leq 0.037$ ; Table 2). Vasilatos and Wangsness (1980) observed a negative correlation between meal size and number of meals, i.e. in cows, increasing meal size decreases frequency of feeding. The number of meals observed in our trial for all dietary treatments, except for the corn-SFM diet, agrees with the number of meals reported for steers fed high concentrate diets (Gibb et al., 1998; Cooper et al., 1999; Erickson et al., 2003) and for dairy cows (Vasilatos and Wangsness, 1980), when meal criterion of 20 min was considered. Daily intake does not equal the product of the mean number of meals per day and meal size because the number of meals and intake per meal are inversely related and the product of their means will differ from the means of their product (Table 2; Friggens et al., 1998; Tolcamp et al., 2000). Eating rate tended to be faster ( $P = 0.067$ ) for barley-SFM than for corn-SFM diet ( $26.82$  vs.  $19.18 \pm 81.24$  g/min; Table 2), possibly because of a higher number of intra-meal intervals without eating in the corn-SFM diet due to the longer duration of meal criterion.

Dietary treatment had no effect on daily percentages of posture and behavior activities (Table 3), except for the time spent eating, which tended to be higher ( $P = 0.086$ ) in desynchronized diets. In general, heifers spent  $9.97 \pm 0.83$  % of the day eating,  $2.11 \pm 0.42$  % drinking,  $25.13 \pm 1.36$  % ruminating,  $16.97 \pm 1.42$  % doing other activities, such as social behavior and self-grooming, and the rest of the day ( $45.82 \pm 2.55$  %) resting or doing non-chewing activities. Percentage of the day spent eating agrees with data reported for feedlot cattle (Hicks et al., 1989) and was lower than data reported for dairy cattle (Albright, 1993). In high concentrate diets it is common to observe a higher percentage of time spent ruminating than eating, reflecting the greater ease of bolus formation and swallowing for grains compared with forages (Beauchemin and Rode, 1997). Total time spent eating estimated by visual observation was lower than that recorded by scales (No. of meals/d x meal length), because the scales included

the pauses inside a meal as eating and by visual observation eating was only recorded when heifers were with their muzzle in the feed, chewing or swallowing.

**Table 3.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on daily percentages of posture and behaviors<sup>a</sup>

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>d</sup>		
	SBM <sup>b</sup>	SFM <sup>c</sup>	SBM <sup>b</sup>	SFM <sup>c</sup>		NSC	CP	NSC x CP
Observations, n	4	4	4	4				
Posture								
Standing	31.89	32.09	33.12	32.22	1.58	0.645	0.811	0.745
Lying	68.11	67.91	66.88	67.78	1.58	0.645	0.811	0.745
Behaviors								
Eating	9.94	9.27	9.51	11.15	0.83	0.233	0.415	0.086
Drinking	1.94	2.16	2.22	2.14	0.42	0.523	0.994	0.912
Ruminating	27.07	24.62	24.34	24.47	1.36	0.325	0.482	0.375
Resting	45.62	45.69	47.34	44.62	2.55	0.841	0.413	0.390
Other activities <sup>e</sup>	15.43	18.25	16.59	17.62	1.42	0.790	0.186	0.503

<sup>a</sup>Daily percentages = (No. of counted postural or behavioral activities/ No. of total observations) x 100, and are presented as untransformed means. Statistical analyses were on square root-arc sine transformed data.

<sup>b</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>c</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>d</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect.

<sup>e</sup>Other activities: include self-grooming, self-licking any part of the body or scratching against the fixtures of the stall; social behaviors; licking the fixtures of the stall and observing.

In general heifers spent more time lying than standing (67.67 vs. 32.33 %;  $P < 0.001$ ). Similar time spent lying was observed by Jensen (1995), Wilson et al. (1999) and Mattiello et al. (2002) for calves of a similar age. While standing, heifers mainly ate, drank and performed other activities, whereas resting and ruminating were mainly performed while lying (Table 4), in agreement with Albright (1993).

When lying, heifers spent more time on the right than on the left side (52.72 vs. 47.28 %;  $P = 0.012$ ). Resting was performed mainly lying on the right side ( $P < 0.001$ ), whereas heifers ruminated the same time ( $P = 1.00$ ) on the right as on the left side

(Table 4). Normally ruminants exhibit left-side laterality when lying, i.e. they prefer to lie on their left side (Albright, 1993). Ruminal cannulated cows markedly increase right side laterality when lying but tend to ruminate while lying on the left, as this posture is supposed to optimize rumination (Grant et al., 1990).

**Table 4.** Effect of animal posture on daily percentages of behaviors<sup>a</sup>

Item	Position			SEM	<i>P</i> -value <sup>b</sup>
	Standing	Right Lying	Left Lying		Position
Observations, n	16	16	16		
Eating	99.44 <sup>x</sup>	0.08 <sup>z</sup>	0.47 <sup>z</sup>	0.90	0.010
Drinking	100.00	0.00	0.00	ND <sup>c</sup>	ND <sup>c</sup>
Resting	16.10 <sup>z</sup>	46.75 <sup>x</sup>	37.15 <sup>y</sup>	1.51	0.001
Ruminating	2.98 <sup>y</sup>	48.28 <sup>z</sup>	48.74 <sup>z</sup>	2.71	0.001
Other activities	71.75 <sup>y</sup>	13.76 <sup>z</sup>	14.50 <sup>z</sup>	1.86	0.001
Self-grooming	60.50 <sup>y</sup>	22.54 <sup>z</sup>	16.96 <sup>z</sup>	3.30	0.001
Social behaviors	90.09	6.08	3.83	0.45	0.329
Licking	45.85	22.03	32.12	3.90	0.222
Observing	95.93	2.98	1.08	1.15	0.436

<sup>a</sup>Daily percentages of each behavior = (No. of counted observations in each position/ No. of total counted observations in all positions) x 100, and are presented as untransformed means. Statistical analyses were on square root-arcsine transformed data.

<sup>b</sup>Effects of NSC, CP source, NSC x CP interaction and period were not significant ( $P > 0.10$ ).

<sup>c</sup>ND: not determined.

<sup>x-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

The time of day also had a significant effect on animal position and on behavior activities. For all diets, eating mainly took place in the first 4 h postfeeding ( $P = 0.001$ ) while heifers were standing (Table 5), in response to daily feed delivery, typical of animals offered feed once a day (Vasilatos and Wangness, 1980; Campbell et al., 1992; DeVries et al., 2003). In all diets, although meals were distributed uniformly during the day, meal size decreased ( $P < 0.001$ ; data not shown) linearly as the time postfeeding progressed (average meal size  $1588 \pm 425$  g during the first 4 h postfeeding and  $265 \pm 81$  g at night, data not shown), in agreement with Tolkamp et al. (2000). This result showed that continuous lighting had no effect on feeding behavior. Feed delivery and

change of ambient temperature and of natural light with sunrise and sunset may have a greater effect on eating behavior than artificial photoperiod, unless heifers were in environmentally controlled chambers (Tanida et al., 1984). Resting and ruminating were performed mainly at night (12-24 h postfeeding) while heifers were lying ( $P = 0.001$ ; Tables 4 and 5), in agreement with Beauchemin et al. (1990), Grant et al. (1990) and Campbell et al. (1992). Other activities were performed at night in the short periods when heifers were standing and drinking took place uniformly throughout the day, while heifers were standing (Tables 4 and 5).

**Table 5.** Effect of time postfeeding on daily percentages of posture and behavioral activities<sup>a</sup>

Item	Time postfeeding, h				SEM	<i>P</i> -value <sup>b</sup>
	0-4	4-8	8-12	12-24		Time
Observations, n	16	16	16	16		
Position						
Standing	27.53 <sup>y</sup>	18.95 <sup>z</sup>	22.70 <sup>x</sup>	30.82 <sup>y</sup>	1.07	0.001
Right lying	13.97 <sup>y</sup>	16.12 <sup>y</sup>	15.20 <sup>y</sup>	54.71 <sup>z</sup>	0.96	0.001
Left lying	8.82 <sup>y</sup>	15.64 <sup>x</sup>	12.33 <sup>x</sup>	63.55 <sup>z</sup>	1.01	0.001
Behavior						
Eating	40.54 <sup>z</sup>	16.67 <sup>y</sup>	22.54 <sup>x</sup>	20.25 <sup>x,y</sup>	1.62	0.001
Drinking	27.26	20.89	23.19	28.66	2.80	0.160
Resting	14.01 <sup>y</sup>	16.66 <sup>y</sup>	15.61 <sup>y</sup>	53.72 <sup>z</sup>	1.00	0.001
Ruminating	9.43 <sup>y</sup>	15.52 <sup>x</sup>	11.75 <sup>y,x</sup>	63.30 <sup>z</sup>	1.47	0.001
Other activities	19.70 <sup>y</sup>	18.58 <sup>y</sup>	23.00 <sup>y</sup>	38.71 <sup>z</sup>	1.47	0.001
Self-grooming	14.93 <sup>y</sup>	20.16 <sup>x</sup>	28.33 <sup>x,z</sup>	36.58 <sup>z</sup>	2.72	0.001
Social behaviors	16.95 <sup>z</sup>	23.13 <sup>z</sup>	35.02 <sup>y</sup>	24.90 <sup>y,z</sup>	2.97	0.001
Licking	12.50 <sup>y</sup>	16.72 <sup>x,y</sup>	21.24 <sup>x</sup>	49.54 <sup>z</sup>	1.97	0.001
Observing	31.58 <sup>z</sup>	15.23 <sup>y</sup>	12.43 <sup>y</sup>	40.76 <sup>z</sup>	2.73	0.001

<sup>a</sup>Daily percentages of each posture or activity = (No. of counted observations in time period/ No. of counted daily observations) x 100, and are presented as untransformed means. Statistical analyses were on square root-arcsine transformed data.

<sup>b</sup>Effects of NSC, CP source, interaction NSC x CP and period were not significant ( $P > 0.10$ ).

<sup>x-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Time spent eating per kg of DM was not affected by dietary treatment, but time spent eating per kg of NDF was higher ( $P = 0.018$ ) for SFM based diets (Table 6), which have lower NDF intake (Table 2). Time spent ruminating per kg of DMI was higher for barley ( $P = 0.001$ ) and SBM ( $P = 0.031$ ) based diets with no effect of NSC and protein source interaction. Soybean meal based diets had higher NDF intake and more time ruminating per kg of DMI was necessary, but when time spent ruminating was expressed per kg of NDF intake, it was higher ( $P = 0.002$ ) for diets with lower NDF intake, i.e. based on barley and SFM, with no effect of their interaction (Table 6).

**Table 6.** Effect of diet on time spent eating, ruminating or total chewing per unit of DM and NDF from forage intake.

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>c</sup>		
	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>	SBM <sup>a</sup>	SFM <sup>b</sup>		NSC	CP	NSC x CP
Observations, n	4	4	4	4				
Eating								
min / Kg DMI	30.83	28.71	26.40	25.60	2.59	0.191	0.590	0.805
min / kg NDFFI <sup>d</sup>	312.10	406.29	284.03	394.61	31.75	0.554	0.018	0.805
Ruminating								
min / kg DMI	83.46 <sup>y</sup>	78.31 <sup>x</sup>	67.54 <sup>x,z</sup>	55.87 <sup>z</sup>	5.13	0.001	0.031	0.320
min / kg NDFFI	845.50 <sup>y</sup>	1105.81 <sup>z</sup>	725.79 <sup>y</sup>	857.65 <sup>y</sup>	35.78	0.002	0.002	0.123
Total chewing								
min / kg DMI	114.29 <sup>y</sup>	107.02 <sup>y</sup>	93.94 <sup>y,z</sup>	81.47 <sup>z</sup>	6.76	0.004	0.101	0.629
min / kg NDFFI	1157.60 <sup>y</sup>	1512.09 <sup>z</sup>	1009.82 <sup>y</sup>	1252.26 <sup>y</sup>	55.18	0.010	0.002	0.349

<sup>a</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>b</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>c</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect.

<sup>d</sup>NDFFI = NDF from forage intake.

<sup>x-z</sup>Within a row, means without a common superscript letter differ (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Total time spent chewing (eating + ruminating) per unit of DM intake, as an indicator of saliva production, was higher ( $P = 0.004$ ) for barley based diets, and time

spent chewing per kg of NDF intake was higher ( $P \leq 0.002$ ) for barley and for SFM based diets, with no effect of their interaction. Beauchemin and Rode (1997) also observed that barley based diets required more chewing per unit of forage intake, partially because of reduced fibrolytic activity associated with lower ruminal pH in barley than corn based diets.

Time spent chewing per kg of DM intake was longer than data reported by Beauchemin et al. (2001) for 450 kg steers fed high concentrate barley-based diets with an average of 5-10 h/d at pH lower than 5.8. In the present experiment, heifers chewed less efficiently but pH did not decrease to acidotic levels.

Chewing time is believed to increase linearly with increasing forage intake (Yang et al., 2001; Maekawa et al., 2002), but the time spent chewing per unit of forage intake decreases as forage intake increases (Deswysen et al., 1987; Beauchemin, 1991a; Yang et al., 2001) due to an increase in the efficiency of rumination. This increase in efficiency can be due to an increased efficiency of particle comminution during mastication or to an increase of microbial digestion of forage (Beauchemin, 1991a), as high forage diets may achieve ruminal conditions more adequate for cellulolysis.

The low efficiency of chewing (more chews per kg of NDF intake) observed in ruminants fed high concentrate diets may respond to a lower fiber degradation in these diets, and may act as an adaptive mechanism in order to break mechanically forage particles and increase the amount of saliva added per unit of DM intake (Grant, 1997). These observations suggest that the effectiveness of forage in promoting chewing increases when present in small amounts in the ration (De Boever et al., 1990; Beauchemin et al., 1994) to compensate low ruminal pH and low cellulolytic activity of animals fed high concentrate diets. After these considerations, chewing time required by animals fed a given amount of forage would be of limited use as an index of the fibrous nature of the forage (Balch, 1971) because it would be influenced by the potential level of intake of animals used and by diet characteristics.

Within the time heifers were performing other activities (Table 7), they spent  $3.01 \pm 0.45$  % of the day self-grooming,  $3.92 \pm 1.13$  % performing social behaviors,  $4.93 \pm 1.20$  % licking or biting fixtures and  $4.85 \pm 0.53$  % observing, with no effect of dietary treatment on this activity distribution. The frequency of these activities agrees with Redbo and Nordblad (1997) for tethered heifers, and the frequency of self-grooming agrees with Mattiello et al. (2002) for veal calves of the same age. Observing is a common activity in tethered heifers, because they are very alert when they are

waiting for feed and listen and look forward to any sound or movement (Redbo and Nordblad, 1997).

Stereotypes are indicators of poor welfare and have been associated with restriction of movement (Redbo, 1992) and low roughage intake (Redbo and Nordblad, 1997), but in the present trial, with tethered heifers fed high concentrate diets, no stereotypes were detected.

**Table 7.** Effect of nonstructural carbohydrate and protein source on daily percentages of other activities<sup>a</sup>

Item	Barley		Corn		SEM	P-value <sup>d</sup>		
	SBM <sup>b</sup>	SFM <sup>c</sup>	SBM <sup>b</sup>	SFM <sup>c</sup>		NSC	CP	NSC x CP
Observations, n	4	4	4	4				
Self-grooming	2.91	3.80	3.25	3.10	0.45	0.567	0.374	0.198
Social behaviors	3.60	4.86	3.68	3.54	1.13	0.370	0.125	0.140
Licking	4.34	5.15	4.54	5.71	1.20	0.787	0.287	0.783
Observing	4.58	4.45	5.12	5.27	0.53	0.069	0.796	0.786

<sup>a</sup>Daily percentages = (No. of counted behavioral activities/ No. of total observations) x 100, and are presented as untransformed means. Statistical analyses were on square root-arc sine transformed data.

<sup>b</sup>SBM = Soybean meal.

<sup>c</sup>SFM = Sunflower meal.

<sup>d</sup>NSC = nonstructural carbohydrate source effect; CP = protein source effect; NSC x CP = interaction effect.

In summary, gross intake was higher for corn based diets and led to a longer meal criterion, lower feeding frequency and larger meal size for the corn-SFM diet. Diet had no effect on percentage of time spent eating and ruminating, therefore when expressed per kg of NDF intake, the diet with lower intake (Barley-SFM) resulted in a longer time spent chewing per unit of intake. Barley-SFM is the most fermentable diet, as it was formulated for rapid synchronization, and the one with lower NDF intake. However, heifers fed this diet could avoid acidosis (A. Rotger, artículo 3) reducing intake and increasing chewing time, resulting in higher feed efficiency for barley based diets (A. Rotger, artículo 3). In these high concentrate diets, time spent chewing was not



positively related to forage intake, the effectiveness of forage increased when forage intake was low.

#### 4. Literature Cited

- Albright, J. L. 1993. Feeding behavior of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 76:485-498.
- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J. Dairy Sci.* 80:1447-1462.
- Balch, C. C. 1971. Proposal to use time spent chewing as an index to extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristics of roughages. *Br. J. Nutr.* 36:383-392.
- Beauchemin, K. A. 1991a. Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and alfalfa hay quality on chewing, rumen function, and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3140-3151.
- Beauchemin, K. A. 1991b. Ingestion and mastication of feed by dairy cattle. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 7:439-463.
- Beauchemin, K. A., and L. M. Rode. 1997. Minimum versus optimum concentrations of fiber in dairy cow diets based on barley silage and concentrates of barley or corn. *J. Dairy Sci.* 80:1629-1639.
- Beauchemin, K. A., R. G. Kachanoski, G. B. Schaalje, and J. G. Buchanan-Smith. 1990. Characterizing rumination patterns of dairy cows using spectral analysis. *J. Anim. Sci.* 68:3163-3170.
- Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, Y. Dong, B. I. Farr, and K. J. Cheng. 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *J. Anim. Sci.* 72:236-246.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, and L. M. Rode. 2001. Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. *J. Anim. Sci.* 79:1925-1936.
- Campbell, C. P., S. A. Marshall, I. B. Mandell, and J. W. Wilton. 1992. Effects of source of dietary neutral detergent fiber on chewing behavior in beef cattle fed pelleted concentrates with or without supplemental roughage. *J. Anim. Sci.* 70:894-903.

- Casper, D. P., D. J. Schingoethe, M. J. Brouk, and H. A. Maiga. 1994. Nonstructural carbohydrate and undegraded protein sources in the diet: growth responses of dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 77:2595-2604.
- Casper, D. P., H. A. Maiga, M. J. Brouk, and J. Schingoethe. 1999. Synchronization of carbohydrate and protein sources on fermentation and passage rates in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1779-1790.
- Cooper, R. J., T. J. Klopfenstein, R. A. Stock, C. T. Milton, D. W. Herold, and J. C. Parrott. 1999. Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. *J. Anim. Sci.* 77:1093-1099.
- Dado, R. G., and M. S. Allen. 1993. Continuous computer acquisition of feed and water intakes, chewing, reticular motility, and ruminal pH of cattle. *J. Dairy Sci.* 76:1589-1600.
- De Boever, J. L., J. I. Andries, D. L. De Brabander, B. G. Cottyn, and F. X. Buysse. 1990. Chewing activity of ruminants as a measure of physical structure: A review of factors affecting it. *Anim. Feed Sci. Technol.* 27:281-291.
- Deswysen, A. G., W. C. Ellis, and K. R. Pond. 1987. Interrelationships among voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility of heifers fed corn silage. *J. Anim. Sci.* 64:835-841.
- Devant, M., A. Ferret, J. Gasa, S. Calsamiglia, and R. Casals. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667-1676.
- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953.
- DeVries, T. J., M. A. G. von Keyserlingk, D. M. Weary, and K. A. Beauchemin. 2003. Measuring the feeding behavior of lactating dairy cows in early to peak lactation. *J. Dairy Sci.* 86:3354-3361.
- Erickson, G. E., C. T. Milton, K. C. Fanning, R. J. Cooper, R. S. Swingle, J. C. Parrot, G. Vogel, and T. J. Klopfenstein. 2003. Interactions between bunk management and monensin concentration on finishing performance, feeding behavior, and ruminal metabolism during an acidosis challenge with feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2869-2879.

- Forbes, J. M. 1995. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. CAB Int., Wallingford, UK.
- Friggens, N. C., B. L. Nielsen, I. Kyriazakis, B. J. Tolcamp, and G. C. Emmans. 1998. Effects of feed composition and stage of lactation on the short-term feeding behavior. *J. Dairy Sci.* 81:2368-3277.
- Gibb, D. J., T. A. McAllister, C. Huisma, and R. D. Wiedmeier. 1998. Bunk attendance of feedlot cattle monitored with radio frequency technology. *Can. J. Anim. Sci.* 73:707-710.
- Grant, R. J. 1997. Interaction among forage and non forage fiber sources on site of fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 80:1438-1446.
- Grant, R. J., and J. L. Albright. 1995. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2791-2803.
- Grant, R. J., V. F. Colenbrander, and J. L. Albright. 1990. Effect of particle size and rumen cannulation upon chewing activity and laterality in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73:3158-3164.
- Herrera-Saldana, R., R. Gomez-Alarcon, M. Tobari, and T. Huber. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142-148.
- Hicks, R. B., F. N. Owen, and D. R. Gill. 1989. Behavioral patterns of feedlot steers. Oklahoma Agricultural Experiment Station MP 127. Stillwater, Oklahoma.
- Hoover, W. H., and S. R. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74: 3630-3644.
- Jensen, M. B. 1995. The effect of age at tethering on behaviour of heifer calves. *Appl. Anim. Behaviour Sci.* 43:227-238.
- Labroue, F., R. Guéblez, P. Sellier, and M. C. Meunier-Salaün. 1994. Feeding behaviour of group-housed Large White and Landrace pigs in French central test stations. *Livest. Prod. Sci.* 40:303-312.
- Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Stroup, and R. D. Wolfinger. 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Maekawa, M., K. A. Beauchemin, and D. A. Christensen. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci* 85:1165-1175.

- Mattiello, S., E. Canali, V. Ferrante, M. Caniatti, F. Gottardo, G. Gozzi, I. Andrighetto, and M. Verga. 2002. The provision of solid feeds to veal calves: II. Behavior, physiology, and abomasal damage. *J. Anim. Sci.* 80:367-375.
- McCarthy, R. D. Jr., T. H. Klusmeyer, J. L. Vicini, and J. H. Clark. 1989. Effects of source of protein and carbohydrate on ruminal fermentation and passage of nutrients to the small intestine of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016.
- Metz, J. H. M. 1975. Time patterns of feeding and rumination in domestic cattle. Mededelingen Landbouwhogeschool, Wageningen 75:1-66.
- Mitlöhner, F. M., J. L. Morrow-Tesch, S. C. Wilson, J. W. Dailey, and J. J. McGlone. 2001. Behavior sampling techniques for feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 79:1189-1193.
- Nielsen, B. L. 1999. On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constraint. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 63:79-91.
- Redbo, I. 1992. The influence of restraint on the occurrence of oral stereotypies in dairy cows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 35:115-123.
- Redbo, I., and A. Nordblad. 1997. Stereotypies in heifers are affected by feeding regime. *Appl. Anim. Behaviour Sci.* 53:193-202.
- Rotger, A., A. Ferret, S. Calsamiglia, and X. Manteca. 2005. Changes in ruminal fermentation and protein degradation in growing Holstein heifers from 80 to 250 kg fed high concentrate diets with different forage to concentrate ratio. *J. Anim. Sci.* 83 (*in press*).
- Tanida, H., L. V. Swanson, and W. D. Hohenboken. 1984. Effect of artificial photoperiod on eating behavior and other behavioural observations of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 67:585-591.
- Tolkamp, B. J., D. P. N. Schweizer, and I. Kyriazakis. 2000. The biologically relevant unit for the analysis of short term feeding behaviour. *J. Dairy Sci.* 83:2057-2068.
- Vasilatos, R., and P. J. Wangsness. 1980. Feeding behavior of lactating dairy cows as measured by time-lapse photography. *J. Dairy Sci.* 63:412-416.
- Wilson, L. L., T. L. Terosky, C. L. Stull, and W. R. Stricklin. 1999. Effects of individual housing design and size on behavior and stress indicators of special-fed Holstein veal calves. *J. Anim. Sci.* 77:1341-1347.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Barley processing, forage:concentrate, and forage length effects on chewing and digesta passage in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 84:2709-2720.

## **CAPÍTULO 3**

### **DISCUSIÓN GENERAL DE RESULTADOS**

A continuación se discutirán conjuntamente los resultados más relevantes respecto a los parámetros productivos, a la fermentación ruminal y a la degradación ruminal de la proteína observados en terneras en crecimiento alimentadas con dietas concentradas. También se discutirán las características del comportamiento de ingestión de estos animales, así como los resultados de fermentación ruminal y de síntesis microbiana obtenidos *in vitro* en el sistema de fermentadores de doble flujo continuo.

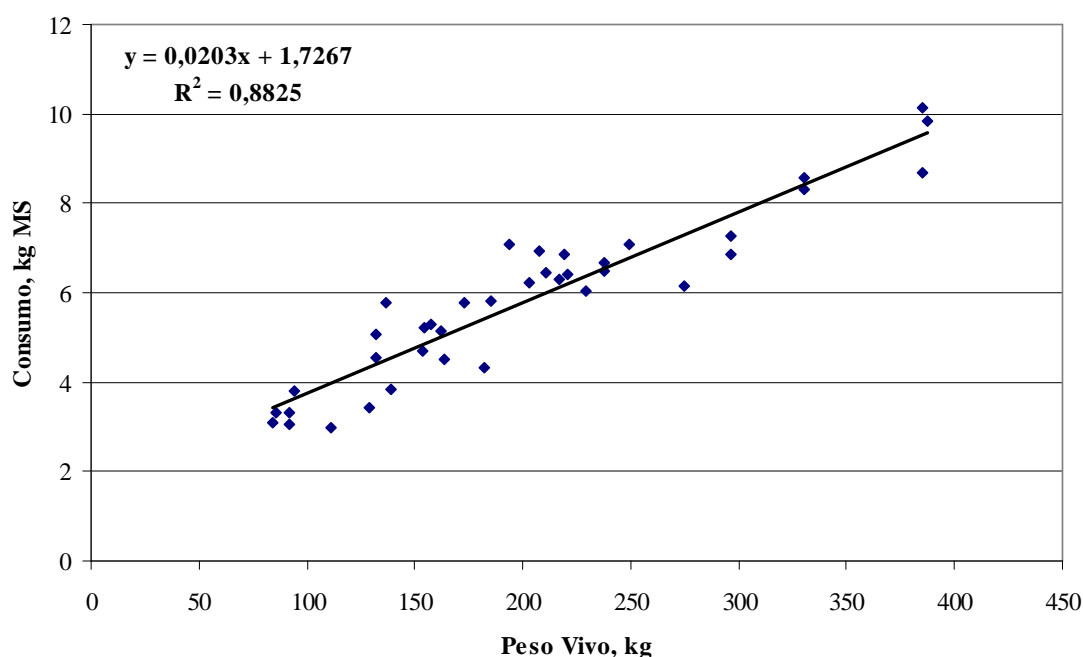
### **1. Parámetros productivos: crecimiento e ingestión.**

En ningún experimento el crecimiento se vio afectado por el tipo de dieta, ya que las dietas a comparar dentro de cada experimento se formularon isoenergéticas e isoproteicas. Las diferencias en ingestión observadas en el experimento 3, donde se combinaron la cebada y el maíz, con la harina de soja y la harina de girasol, no se tradujeron en diferencias en el crecimiento, sino en diferencias en la eficiencia de conversión, siendo ésta más favorable en las dietas a base de cebada (Tabla 2, artículo 3).

La ganancia media diaria en los tres experimento fue similar a la estimada por el programa del NRC (1996) utilizado para formular las dietas. Sin embargo fue superior en el experimento 3 (1,2 kg/día) que en los experimentos 1 (0,9 kg/día) y 2 (1 kg/día). Todas las dietas tuvieron similar concentración energética (2,8 Mcal/kg MS) e ingestión, por lo que el menor crecimiento en el primer experimento podría deberse a una mayor duración del experimento y/o a un efecto negativo de la canulación ruminal. A las terneras del experimento 1, con la necesidad de introducir las bolsas para la incubación *in situ* de los suplementos vegetales, se les colocó una cánula ruminal de 3,5 cm de diámetro interno, a las 8 semanas de edad, cuando tenían un peso medio de 62 kg. En cambio, a las terneras del tercer experimento se les colocó un trocar ruminal de 1 cm de diámetro interno a las 14 semanas de edad. Vazquez-Añón y col. (1993) y Lallès y Poncet (1990) observaron que el crecimiento de terneros que habían sido canulados a las 3 semanas de edad era inferior al estimado por el NRC (1996), por lo que la canulación ruminal de animales jóvenes puede afectar a su crecimiento, disminuyéndolo.

Aunque los ingredientes concentrados y el forraje se daban mezclados, en forma de ración total mezclada (TMR) en los experimentos 1 y 2, y manualmente en el experimento 3, las terneras eran capaces de seleccionar entre estos dos tipos de ingredientes, ya que el forraje siempre tuvo un tamaño de partícula superior a los 2,8

cm, que correspondió al tamaño de partícula de la alfalfa deshidratada incluida como fuente forrajera en el experimento 1 y 2. Este hecho se notó especialmente en los experimentos 1 y 2, ya que a pesar de la diferencia en la concentración de fibra neutro detergente (FND) de las dietas formuladas, no se observaron diferencias en la ingestión de FND entre tratamientos. La alfalfa deshidratada era la fuente forrajera de la dieta con mayor proporción de forraje de los experimentos 1 y 2, y este forraje conservado puede tener una menor aceptación (Marshall y col., 1992), por lo que podría ayudar a explicar la falta de diferencias en el consumo de FND entre dietas.



**Figura 1.** Ajuste lineal del consumo de materia seca en función del peso vivo.

Como era de esperar, el consumo de materia seca (MS) y de todos los nutrientes dietarios aumentó con la edad en función del peso vivo (PV), y al analizar conjuntamente todos los datos de consumo de los 3 experimentos *in vivo* obtuvimos la siguiente ecuación de predicción de la ingestión de materia seca en función del PV:  $IMS = 1,7267 + 0,0203 PV$ ;  $n = 38$ ;  $P < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,88$ ;  $CV = 11\%$  (Figura 1). Sin embargo, al expresar el consumo por kg de peso metabólico se mantuvo constante con la edad para todos los nutrientes, a excepción de la fibra. En el experimento 3 donde trabajamos con dietas con una relación forraje:concentrado cercana a 10:90, el consumo de fibra forrajera por kg de peso metabólico aumentó linealmente desde los 132 a los 266 kg (datos no mostrados). Este aumento en el consumo de fibra con la edad no fue

estadísticamente significativo en el experimento 1, aunque sí se observó un descenso en el contenido de fibra de los rechazos. A las 13 semanas de edad los rechazos tenían un gran contenido de forraje, porque las terneras seleccionaban por la parte concentrada de la ración; a las 27 semanas prácticamente no seleccionaban y a las 41 semanas el contenido en fibra de los rechazos era inferior que en la ración ofrecida (Figura 2; artículo 1). Este aumento en la ingestión de forraje con la edad también fue observado por Devant y col. (2000) administrando el concentrado y la paja por separado, pasándose de una relación forraje:concentrado de 5:95, a los 100 kg de PV, a 8:92, a los 230 kg de PV. Este hecho, más que indicar un aumento en la selección de forraje, indicaría una disminución en la selección de las partes más nutritivas de la ración con la edad. Los animales más pequeños, con menor capacidad fermentativa, necesitan alimentos más nutritivos (Demment y Greenwood, 1988).

## 2. Fermentación ruminal

### 2.1. pH

El mayor riesgo de las dietas concentradas utilizadas en el engorde de terneros, es la acidosis ruminal. La acidosis puede ser aguda, por cambios bruscos en la alimentación y provocando, en casos extremos, la muerte del ternero; o crónica, también llamada subclínica, manifestándose con variaciones en la ingestión y disminución del crecimiento (Owens y col., 1998).

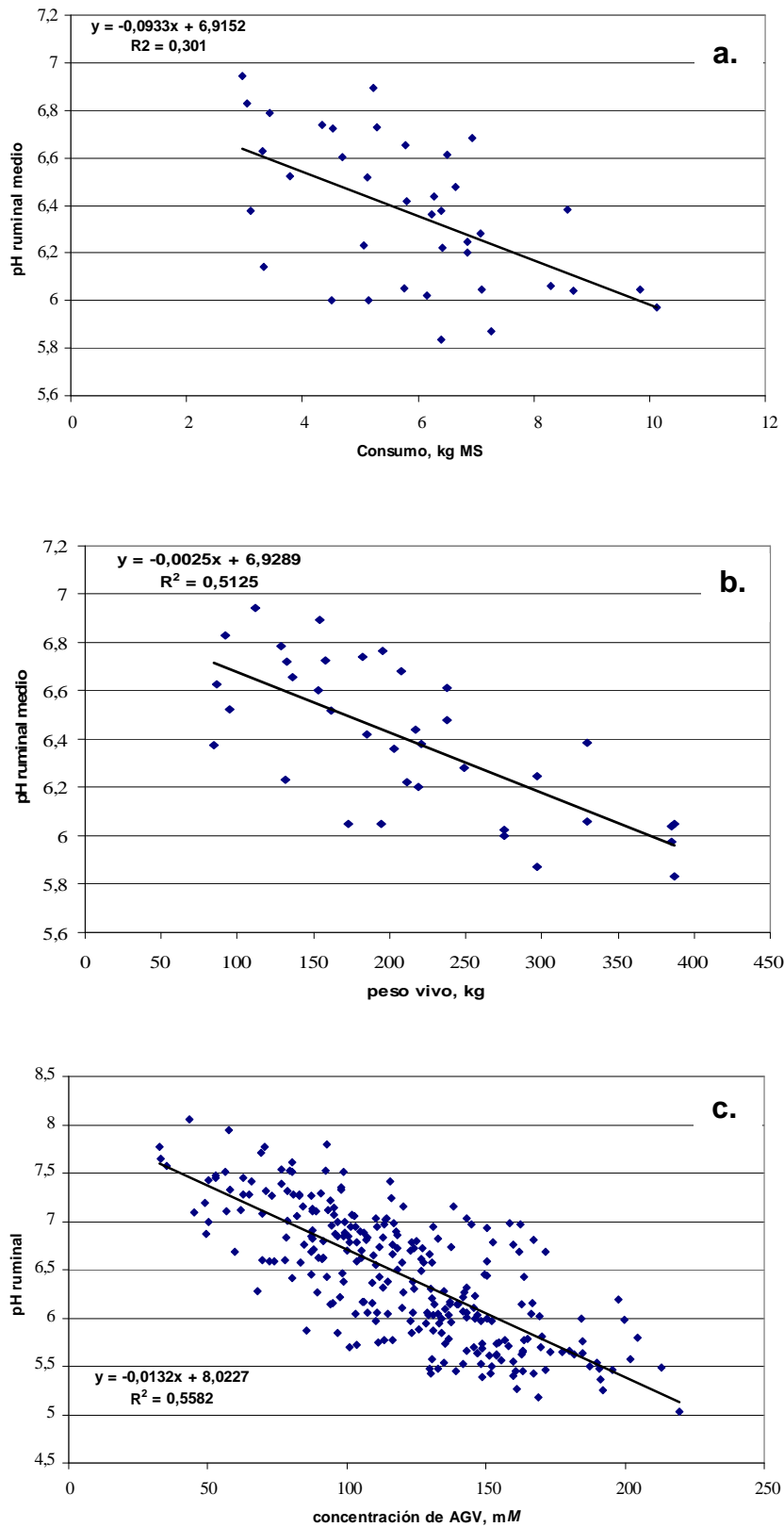
La acidosis subclínica es más difícil de identificar, y se han fijado arbitrariamente diferentes umbrales de pH ruminal que van desde valores de 5,5 hasta 6,0 (Schwartzkopf-Genswein y col., 2003). El pH medio en el experimento 1, con terneras en crecimiento entre los 80 y los 250 kg de PV, fue de 6,35; en el experimento 2, entre los 300 y los 370 kg de PV, de 6,0; y en el experimento 3, entre los 132 a los 266 kg, de 6,5; sin verse el pH medio afectado ni por el nivel de fibra de la dieta (experimentos 1 y 2), ni por el tipo de cereal utilizado (experimento 3). Devant y col. (2000, 2001) tampoco obtuvieron valores medios de pH ruminal indicadores de acidosis ruminal.

Sin embargo, el pH medio es un mal indicador de la acidosis subclínica, ya que no refleja las fluctuaciones diarias del pH. Las curvas de la evolución diaria del pH ruminal observadas en los tres experimentos *in vivo* (experimentos 1, 2 y 3) son características de terneros alimentados una sola vez al día, y que no tienen problemas de competencia para acceder al comedero (Krause y col., 1998; Devant y col., 2000, 2001).



Estas curvas tampoco se vieron afectadas ni por el nivel de fibra (experimento 1 y 2) ni por el tipo de cereal de la dieta (experimento 3). En ningún experimento las terneras estuvieron más de 12 h al día a pH inferior a 5,8, que también ha sido utilizado como límite para definir la acidosis subclínica (Schwartzkopt-Genswein y col., 2003). Es más, en el experimento 4, trabajando *in vitro* con fermentadores de doble flujo continuo, la fermentación ruminal y la síntesis microbiana de las 4 dietas formuladas a partir de cebada o maíz, como fuente energética y harina de soja o harina de girasol, como fuente proteica, no se vieron afectadas al reducir el pH a 5,8 durante 12 horas al día, de acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio por Calsamiglia y col. (2002). Estos resultados muestran que las fluctuaciones de pH observadas *in vivo* no afectaron marcadamente ni a la fermentación ruminal ni a la degradación de la fibra o de la proteína.

En el experimento 1 el pH medio no varió con la edad, aunque al observar la curva de la evolución diaria del pH (Figura 3, artículo 1), a las 13 semanas de edad el pH recuperó más rápidamente los niveles altos de prealimentación que a las 27 o 41 semanas de edad, posiblemente por una menor ingestión. El pH medio del experimento 2, en la fase final de engorde fue más bajo que en el experimento 1, y al analizar conjuntamente los experimentos 1 y 2 observamos como el pH medio disminuyó estadísticamente ( $P = 0,021$ ) con la edad desde las 13 hasta las 54 semanas de vida. Al analizar los datos de pH medio de los 3 experimentos *in vivo* observamos que el pH medio disminuyó en función del consumo de MS ( $n = 38$ ;  $P < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,301$ ;  $CV = 4\%$ ) y del peso vivo ( $n = 37$ ;  $P < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,512$ ;  $CV = 3\%$ ) (Figuras 2a y 2b), posiblemente por el aumento en la concentración de los ácidos grasos volátiles (AGV). La concentración de AGV explicó el 56% de las variaciones del pH ( $n = 273$ ;  $P < 0,0001$ ;  $CV = 3\%$ ) (Figura 2c). También al analizar los experimentos 1 y 2 conjuntamente, el tiempo diario en que el pH fue inferior a 5,8 aumentó con la edad, indicando que el riesgo de acidosis aumenta en las últimas fases del cebo, aunque los animales hayan recibido durante todo el engorde la misma dieta concentrada.



**Figura 2.** Ajuste lineal del pH ruminal en función del consumo de MS (a), del peso vivo (b) y de la concentración de AGV (c).

## 2.2. Ácidos Grasos Volátiles

Las concentraciones totales, así como las concentraciones relativas de los AGV fueron las características de dietas concentradas (Rogers y Davis, 1982), excepto a las 13 semanas de edad en el experimento 1, donde se observó una relación acetato:propionato superior que en los otros muestreos y que los valores observados en otros trabajos con terneros jóvenes alimentados con dietas concentradas (Vazquez-Añón y col., 1993). Posiblemente esta mayor concentración de acetato se debió a que el pH ruminal medio y mínimo fueron muy altos (6,5 y 5,95, respectivamente) y en estas condiciones la producción de propionato se reduce (Sutton, 1981; Anderson y col., 1987).

El nivel de fibra de la dieta no afectó marcadamente al perfil de AGV. En el experimento 1 se observó una tendencia a una mayor concentración de acetato ( $P = 0,098$ ) y a una menor de ácidos grasos volátiles ramificados (AGVR) ( $P = 0,093$ ) en la dieta que contenía un 30% de alfalfa deshidratada, que juntamente con una mayor degradación del heno de alfalfa incubado *in situ*, se atribuyó a una mayor actividad celulolítica en esta dieta frente a la dieta que contenía un 12% de paja. Estas diferencias entre dietas no se observaron en el experimento 2, posiblemente porque al aumentar con la edad la ingestión de carbohidratos no estructurales, el perfil de fermentación se volvió más amilolítico en ambas dietas. En el experimento 3 la concentración de AGV y el perfil de fermentación fueron similares que los observados a las 27 semanas de edad en el experimento 1, sin verse afectado por el tipo de cereal ni por la fuente proteica, destacando una mayor concentración de AGVR que en los experimentos 1 y 2.

En el experimento 1 observamos que la concentración de AGV aumentó desde la semana 13 a la 41 de edad, y al analizar el experimento 1 y 2 conjuntamente, la concentración total de AGV siguió aumentando ( $P = 0,009$ ) hasta las 54 semanas de edad al final del experimento 2. Este aumento en la concentración de AGV con la edad, no concuerda con los resultados de Quigley y col. (1985), donde la concentración ruminal de AGV a las dos semanas postdestete era similar a la de un adulto.

La concentración ruminal de AGV resulta del balance entre producción y absorción, mayoritariamente a través de la pared ruminal (France y Siddons, 1993). La capacidad de absorción de la pared ruminal aumenta con el desarrollo ruminal y con la edad (Anderson y col., 1987). Al no haber en nuestro experimento 1 ningún factor que nos indique que la capacidad de absorción esté anormalmente disminuida, podemos

afirmar que la producción de AGV, es decir la capacidad fermentativa, aumentó con la edad.

En el experimento 1 y 3, al disminuir con la edad la preferencia por el concentrado, el consumo relativo de fibra aumentó. Sin embargo, este aumento en el consumo de fibra no se tradujo en un aumento de la actividad celulolítica, ya que ni la proporción de acetato, ni la degradación del heno de alfalfa incubado *in situ* en el experimento 1 aumentaron con la edad. Aunque la ingestión de forraje aumentara, estamos hablando de ingestiones de forraje muy bajas, y el aumento en la cantidad de carbohidratos no fibrosos ingeridos puede ser más determinante para la fermentación ruminal que no el aumento relativo en la ingestión de fibra. Con la edad la fermentación ruminal se volvió más amilolítica, aumentando la concentración total de AGV y la proporción de propionato. Esto contrasta con los resultados obtenidos por Devant y col. (2000), donde aumentos de 3 unidades porcentuales en la relación forraje:concentrado, sí se tradujeron en un aumento en la actividad celulolítica, estimada a partir de la degradación de la paja incubada *in situ* y de la concentración de acetato.

La concentración de BCVFA disminuyó con la edad en el experimento 1 y se siguió manteniendo baja en el experimento 2. La tendencia hacia una fermentación más amilolítica aumentaría la utilización de péptidos y aminoácidos para la síntesis microbiana (Russell y col., 1983), disminuyendo la concentración de AGVR como paso final del metabolismo de aminoácidos. Este hecho no se vio corroborado por una disminución en la concentración de amoníaco con la edad.

### **2.3. Amoníaco**

La concentración ruminal de nitrógeno amoniacal vendrá determinada por muchos factores como la degradación de compuestos nitrogenados, su incorporación a la síntesis de proteína microbiana y su salida de rumen, hacia el abomaso ligado a la fracción líquida o a través de la pared ruminal.

En el experimento 1 y 2, la concentración de amoníaco fue superior a la concentración mínima de 5 mg/100 ml, necesaria para maximizar el crecimiento microbiano propuesta por Satter y Slyter (1974). En cambio en el experimento 3 estuvo por debajo de este límite (3,93 mg/100 ml) y se vio afectada por el tipo cereal de la dieta, siendo inferior en las dietas a base de maíz. Estas diferencias entre experimentos pueden deberse a diferencias en la concentración proteica de las dietas. En el experimento 1 y 2 las dietas contenían un 15% de proteína, y en el experimento 3 un

14%. Señalando que en las dietas a base de maíz la concentración proteica fue un poco inferior (13%), aunque el consumo proteico por kg de peso metabólico se compensó por una mayor ingestión en las dietas que contenían maíz.

Al estudiar la fermentación de las dietas a base de cebada y maíz combinadas con harina de soja y harina de girasol *in vitro* (experimento 4), obtuvimos unas concentraciones de amoniaco incluso más bajas que las obtenidas *in vivo* con las mismas dietas: 1,17 mg/100 ml en las dietas de cebada y 0,5 mg/100 ml en las dietas de maíz. Por efecto de la defaunación es frecuente observar *in vitro* una concentración amoniacal más baja (Wallace y Cotta, 1988). Sin embargo, los altos valores obtenidos de digestibilidad de la MO, flujo microbiano y degradabilidad proteica (Tabla 4, artículo 3) indican que estas bajas concentraciones de amoniaco no limitaron la fermentación ruminal ni el crecimiento microbiano. En dietas concentradas, los péptidos y aminoácidos pueden llegar a representar el 66% del nitrógeno incorporado a la síntesis de proteína microbiana (Russell y col., 1983), sin que ésta se vea limitada por bajas concentraciones ruminales de amoniaco.

En los 3 experimentos *in vivo*, la evolución diaria de la concentración de amoniaco fue paralela a la del pH, disminuyendo en las primeras horas y recuperándose a partir de las 12-16 h postalimentación, excepto en las dietas a base de maíz del experimento 3 donde su fluctuación diaria fue prácticamente irrelevante. Esta evolución coincide con la obtenida con Devant y col. (2000) con dietas concentradas, pero es muy diferente de las observadas en otros trabajos con dietas forrajeras (Bourquin y col., 1994), donde la concentración de amoniaco aumenta después de la administración de comida, como resultado de la degradación de la proteína dietaria. En dietas ricas en cereales, la energía está en exceso y es degradada rápidamente por una flora predominantemente amilolítica. Los productos de la degradación proteica, sean péptidos, aminoácidos o amoniaco serán incorporados rápidamente a la síntesis de proteína microbiana (Russell y col., 1983), por lo que será difícil observar un aumento en la concentración de amoniaco después de comer.

En el experimento 1, la concentración de amoniaco no varió con la edad, aunque sí observamos que con la edad aumentó la degradación proteica de los suplementos incubados *in situ*. Estas observaciones, conjuntamente con las curvas de amoniaco observadas y los parámetros de fermentación y síntesis de proteína microbiana obtenidos *in vitro*, nos confirman que la concentración de amoniaco es un mal indicador de degradación proteica en dietas concentradas.

### 3. Degradabilidad proteica ruminal de suplementos vegetales

La degradación de la proteína de suplementos vegetales frecuentemente se reduce en dietas concentradas (Ganev y col., 1979). Esto es debido a un efecto directo del pH ácido, común en estas dietas, sobre las poblaciones proteolíticas (Erflé y col., 1982; Shriver y col., 1986) y sobre la solubilidad proteica (Loerch y col., 1983), y a un efecto indirecto sobre la degradación de la fibra (Hoover, 1986). La proteína de determinados suplementos vegetales parece estar protegida por una estructura fibrosa que tiene que degradarse en primer lugar por los microorganismos celulolíticos, para que los proteolíticos puedan acceder a su substrato (Wallace y Cotta, 1988).

El objetivo del experimento 1 y 2 no era comparar la degradabilidad proteica entre una dieta concentrada y una forrajera, sino ver si pequeñas diferencias en la concentración de FND de dietas concentradas podían afectar a la actividad fibrolítica y a la degradación proteica de suplementos de origen vegetal. La actividad fibrolítica fue muy baja en ambos experimentos, siendo la degradabilidad efectiva de la FND del heno de alfalfa incubado *in situ* del 21,1 y del 25,5 % en el experimento 1 y 2, respectivamente. Aunque el pH ácido es considerado como el principal factor responsable de inhibir la degradación de la fibra en dietas concentradas (Hoover, 1986), no lo fue en nuestros experimentos, por lo que debieron intervenir otros factores como la preferencia por los carbohidratos no estructurales, o la ausencia de una flora celulolítica estable, que no se pudo establecer porque las terneras nunca tuvieron acceso a grandes cantidades de forraje (Mould y Ørskov, 1983).

En el experimento 1, aún siendo muy baja la degradación de la FND del heno de alfalfa incubado *in situ*, fue ligeramente superior en la dieta que contenía un 30% de alfalfa deshidratada. Esta mayor actividad fibrolítica se tradujo en un mayor ritmo de degradación y en una mayor degradabilidad efectiva del guisante y del altramuza, en la dieta con mayor proporción de forraje. En cambio, la harina de soja se degradó por igual en ambas dietas y la harina de girasol se degradó más rápidamente y en mayor grado en la dieta que contenía menor proporción de forraje y menor actividad fibrolítica.

En el experimento 2 no se observó ninguna diferencia en el perfil de fermentación ni en la degradación de la FND del heno de alfalfa entre dietas, por lo que tampoco se observó ningún efecto del nivel de fibra de la dieta sobre la degradación de los suplementos proteicos incubados. Los valores de degradabilidad efectiva estimados para la harina de soja y la harina de girasol, fueron similares a los propuestos por las tablas de referencia (AFRC, 1993; INRA, 1988; FEDNA, 2003) y estimados en

rumiantes adultos que recibían una dieta mayoritariamente forrajera. En cambio, los valores estimados para las leguminosas grano fueron inferiores a los obtenidos en otros trabajos *in situ* (Cross y col., 1991a,b; Petit y col., 1997; Djouvinov y col., 1998) e inferiores a los valores propuestos por las tablas de referencia mencionadas anteriormente, posiblemente por el efecto de la dieta base sobre la degradación proteica.

En ambos experimentos, los dos subproductos de la extracción de aceite (harina de soja y harina de girasol) parecen no verse afectados por el nivel de fibra de la dieta. Este hecho puede ser debido a que durante la extracción del aceite con solventes, la proteína haya sufrido modificaciones en su estructura y su degradación no venga supeditada a la degradación previa de una estructura fibrosa. Otros estudios sí han observado efecto del nivel de concentrado de la dieta sobre la degradación proteica de la harina de soja (Devant y col., 2000; Molero y col., 2004), aunque en éstos las dietas comparadas eran extremas.

Lallès y Poncet (1990) y Vazquez-Añón y col. (1993) observaron que la degradación ruminal de la proteína aumentaba alrededor del destete, pero que un par de semanas consumiendo alimento sólido eran suficientes para adquirir un perfil de fermentación y una capacidad degradativa equivalente al animal adulto. Sin embargo, nosotros observamos en el experimento 1 que la fermentación ruminal seguía cambiando en fases posteriores al destete; a medida que aumentó el consumo de carbohidratos no estructurales, la fermentación ruminal evolucionó hacia un perfil más amilolítico. La velocidad de degradación y la degradabilidad efectiva de los suplementos proteicos incubados, excepto la harina de soja, aumentó en 7,7 unidades porcentuales desde las 13 semanas de edad hasta las 41, siendo el aumento más marcado entre las 13 y las 27 semanas de edad (Experimento 1). El aumento observado en la actividad fermentativa en general (concentración de AGV), y especialmente de la flora amilolítica, que tiene mayor actividad proteolítica (Siddons y Paradine, 1981), explicaría este aumento en la degradación proteica.

En el experimento 2, la velocidad de degradación ya no aumentó respecto a la semana 41 del experimento 1, primero porque la separación entre ambos experimentos fue menor (2 semanas), y en segundo lugar porque posiblemente se había llegado al máximo. En cambio, los valores de degradabilidad efectiva son ligeramente superiores en el experimento 2 que a las 41 semanas de edad del experimento 1. Posiblemente porque en este segundo experimento el ritmo de paso fue menor (5,7 %/h) que en el

primer experimento (6,99 %/h). Un menor ritmo de paso comporta un mayor tiempo de retención y una mayor degradabilidad.

#### 4. Sincronización energía-proteína

En el experimento 2, observamos que había grandes diferencias en el ritmo de degradación del nitrógeno entre los suplementos proteicos. La harina de girasol se degradaba significativamente más rápido que la harina de soja y las otras leguminosas grano. Con ello hipotizamos que si sincronizábamos la degradación de estas fuentes proteicas con la degradación del almidón de los cereales, mejoraría la fermentación ruminal y la síntesis de proteína microbiana. Por eso, combinamos la harina de soja y la harina de girasol con los dos cereales más utilizados en la alimentación intensiva de terneros (cebada y maíz), que tienen diferentes velocidades de degradación del almidón a nivel ruminal (Nocek y Tamminga, 1991).

*In vitro* observamos como las dietas sincronizadas (cebada-girasol y maíz-soja) tendieron a una mayor digestibilidad de la materia orgánica (MO), una mayor concentración de AGV y un mayor flujo de nitrógeno microbiano. La interacción entre las fuentes de energía y de proteína afectó la fermentación y la síntesis de proteína microbiana, a diferencia de otros trabajos *in vitro*, donde han observado que vienen determinados por el primer nutriente limitante (Newbold y Rust, 1992; Mansfield y col., 1994). Sin embargo, *in vivo* las dietas sincronizadas no presentaron ninguna ventaja frente a las combinaciones desincronizadas, a excepción de una menor amplitud en el rango de pH observado durante el muestro diario (pH máximo-pH mínimo). Las fuentes endógenas posiblemente pueden compensar la falta de nitrógeno y otros nutrientes, en un periodo de restricción durante el ciclo alimentario, y solucionar los problemas de falta de sincronización (Firkins, 1996). Es más, la sincronización por una fermentación rápida no causó un aumento en la concentración de AGV y la acidificación del pH ruminal, posiblemente por las diferencias observadas en el comportamiento de ingestión (artículo 4).

#### 5. Comportamiento de ingestión

La dieta sincronizada para una fermentación rápida (cebada-girasol) del experimento 3, aún siendo la que presentó un menor consumo de forraje, no causó problemas de acidosis ruminal (pH medio 6,5). Las terneras al consumir esta dieta disminuyeron su ingestión y la masticaron durante más tiempo, lo que pudo aumentar la



producción de saliva y evitar descensos en el pH ruminal. Esto indicaría que en función de la cantidad de forraje consumido y de la fermentabilidad de la dieta, los terneros pueden regular su comportamiento para evitar problemas de acidosis ruminal.

En dietas forrajeras, el tiempo dedicado a rumiar por unidad de forraje ingerido es constante, e incluso puede llegar a disminuir en ingestiones altas de forraje, por una mayor contribución de la masticación durante la ingestión y de la actividad microbiana sobre la degradación de las partículas de forraje (Deswysen y col., 1987; Beauchemin, 1991). Por eso, el tiempo diario dedicado a rumiar aumentará lineal o cuadráticamente con el contenido en forraje de la dieta (Yang y col., 2001; Maekawa y col., 2002). Sin embargo, en dietas concentradas no se mantiene esta relación. La efectividad del forraje para promover la masticación aumenta cuando el forraje está presente en baja cantidad en la dieta (De Boever y col., 1990; Beauchemin y col., 1994), para compensar por el bajo pH y la baja degradación de la fibra en estas dietas. Como vimos en los experimentos 1 y 2, la actividad fibrolítica es muy baja en dietas concentradas, por lo que contribuirá muy poco a la degradación del forraje. Para reducir el tamaño de las partículas de forraje y que éstas puedan salir por el orificio retículo-omasal tendrán que ser masticadas extensivamente durante la rumia. Este aumento en la masticación durante la rumia aumentará la secreción salivar, ayudando a tamponar y previniendo una acidificación del contenido ruminal.

En el experimento 3, observamos que entre los 132 y los 266 kg aumentó la eficacia de masticación, es decir dedicaron menos tiempo a masticar por unidad de forraje ingerido, posiblemente por un aumento en el tamaño de la boca más que a un aumento en la actividad fibrolítica, ya que aunque el consumo de forraje aumentó (datos no mostrados), el perfil de fermentación no varió. En el marco de este experimento, esta disminución en el tiempo destinado a rumiar por kg de forraje ingerido, no se tradujo en una disminución en el pH ruminal, pero sí podría ser la causa de la disminución en el pH ruminal observada al analizar su evolución desde los 80 hasta los 370 kg (experimento 1 y 2).

## **6. Citas bibliográficas**

AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. Agric. Food Res. Council Tech. Comm. on Responses to Nutrients. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.

- Anderson, K. L., T. G. Nagaraja, y J. L. Morril. 1987. Ruminal metabolic development in calves weaned conventionally or early. *J. Dairy Sci.* 70:1000-1005.
- Beauchemin, K. A. 1991. Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and alfalfa hay quality on chewing, rumen function, and milk production of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:3140-3151.
- Beauchemin, K. A., T. A. McAllister, Y. Dong, B. I. Farr, y K. J. Cheng. 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. *J. Anim. Sci.* 72:236-246.
- Bourquin, L. D., E. C. Titgemeyer, N. R. Merchen, y G. C. Fahey. 1994. Forage level and particle size effects on orchardgrass digestion by steers: I. Site and extent of organic matter, nitrogen, and cell wall digestion. *J. Anim. Sci.* 72:746-758.
- Calsamiglia, S., A. Ferret, y M. Devant. 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85:574-579.
- Cros, P., M. Vernay, y R. Moncoulon. 1991a. *In situ* evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole horsebeans. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:249-255.
- Cros, P., C. Benchaar, C. Bayourthe, M. Vernay, y R. Moncoulon. 1991b. *In situ* evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole lupin seed nitrogen. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:575-583.
- De Boever, J. L., J. I. Andries, D. L. De Brabander, B. G. Cottyn, y F. X. Buysse. 1990. Chewing activity of ruminants as a measure of physical structure: A reivew of factors affecting it. *Anim. Feed Sci. Technol.* 27:281-291.
- Demment, M. W., y G. B. Greenwood. 1988. Forage ingestion: Effects of sward characteristics and body size. *J. Anim. Sci.* 66:2380-2392.
- Deswysen, A. G., W. C. Ellis, y K. R. Pond. 1987. Interrelationships among voluntary intake, eating and ruminating behavior and ruminal motility of heifers fed corn silage. *J. Anim. Sci.* 64:835-841.
- Devant, M., A. Ferret, J. Gasa, S. Calsamiglia, y R. Casals. 2000. Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight. *J. Anim. Sci.* 78:1667-1676.

- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, y J. Gasa. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953.
- Djouvinov, D. S., Y. Nakashima, N. Todorov, y D. Pavlov. 1998. *In situ* degradation of feed purines. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71:67-77.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, y F. D. Sauer. 1982. Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 65:1457-1514.
- FEDNA, 2003. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos. C. De Blas, G. G. Mateos, y P. G. Rebollar, eds. Ediciones Peninsular. Tomelloso, Madrid.
- Firkins, J. L. 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J. Nutr.* 126:1347S-1354S.
- France, J., y R. C. Siddons. 1993. Volatile fatty acids production. Pág. 107-121 en: *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* J. M. Forbes y J. France, eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Ganev, G., E. R. Ørskov, y R. Smart. 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *J. Agric. Sci.* 93:651-656.
- Hoover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69:2755-2766.
- INRA. 1988. *Alimentation des bovins, ovins et caprins.* INRA Editions, Paris.
- Krause, M., K. A. Beauchemin, L. M. Rode, B. I. Farr, y P. Nørgaard. 1998. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. *J. Anim. Sci.* 76:2912-2920.
- Lallès, J. P., y C. Poncet. 1990. Changes in ruminal and intestinal digestion during and after weaning in dairy calves fed concentrate diets containing pea or soya bean meal. 1. Digestion of organic matter and nitrogen. *Livest. Prod. Sci.* 24:129-142.
- Loerch, S. C., L. L. Berger, D. Gianola, y G. C. Fahey, Jr. 1983. Effects of dietary protein source and energy level on in situ nitrogen disappearance of various protein sources. *J. Anim. Sci.* 56:206-216.

- Maekawa, M., K. A. Beauchemin, y D. A. Christensen. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci* 58:1165-1175.
- Mansfield, H. R., M. I. Endres, y M. D. Stern. 1994. Influence of non-fibrous carbohydrate and degradable intake protein on fermentation by ruminal microorganisms in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 72:2464-2474.
- Marshall, S. A., C. P. Campbell, I. B. Mandell, y J. W. Wilton. 1992. Effects of source of dietary neutral detergent fiber on feed intake, ruminal fermentation, ruminal digestion in situ, and total tract digestion in beef cattle fed pelleted concentrates with or without supplemental roughage. *J Anim. Sci.* 70:884-893.
- Molero R., M. Ibars, S. Calsamiglia, A. Ferret, y R. Losa. 2004. Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Anim. Feed Sci. Technol.* 114:91-104.
- Mould, F. L., y E. R. Ørskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- Newbold, J. R., y S. R. Rust. 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *J. Animal Sci.* 70:538-546.
- Nocek, J. E., y S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, y D. R. Gill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Petit, H. V., R. Rioux, y D. R. Ouellet. 1997. Milk production and intake of lactating cows fed raw or extruded peas. *J. Dairy Sci.* 80:3377-3385.
- Quigley, J. D., C. G. Schwab, y W. E. Hylton. 1985. Development of rumen function in calves: Nature of protein reaching the abomasum. *J. Dairy Sci.* 68:694-702.
- Rogers, J. A., y C. L. Davis. 1982. Effects of intraruminal infusions of mineral salts on volatile fatty acid production in steers fed high-concentrate and high-roughage diets. *J. Dairy Sci.* 65:953-962.

- Russell, J. B., C. J. Sniffen, y P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66:763-775.
- Satter, L. D., y L. L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32:199-208.
- Schwartzkopf-Genswein, K. S., K. A. Beauchemin, D. J. Gibb, D. H. Crews, Jr., D. D. Hickman, M. Streeter, y T. A. McAllister. 2003. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E149-E158.
- Siddons, R. C., y J. Paradine. 1981. Effect of diet on protein degrading activity in the sheep rumen. *J. Sci. Food Agric.* 32:973-981.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., y W. V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69:413-419.
- Sutton, J. D. 1981. Concentrate feeding and milk composition. Pág. 35-48 en: *Recent advances in animal nutrition*. W. Haresign, ed. Butterworths, London, UK.
- Vazquez-Añón, M., A. J. Heinrichs, J. M. Aldrich, y G. A. Varga. 1993. Postweaning age effect on rumen fermentation end products and digesta kinetics in calves weaned at 5 weeks of age. *J. Dairy Sci.* 76:2742-2748.
- Wallace, R. J., y M. A. Cotta. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds. Pág. 217-250 en: *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, Ed. Elsevier Applied Science, NY.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, y L. M. Rode. 2001. Barley processing, forage:concentrate, and forage length effects on chewing and digesta passage in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 84:2709-2720.

## **CAPÍTULO 4**

### **CONCLUSIONES FINALES**

En el marco de las condiciones experimentales de los tres experimentos realizados *in vivo*, con terneras en crecimiento alimentadas con dietas concentradas con distinto nivel de fibra o con distintas fuentes de carbohidratos y de proteína, y del experimento *in vitro* realizado con estas mismas dietas, podemos concluir:

1. Al elevar el contenido de fibra de 22 a 28 % en dietas concentradas para terneros en cebo, entre los 80 y los 250 kg de peso vivo, se incrementó la actividad fibrolítica, estimada a través de la degradación *in situ* de la fibra de heno de alfalfa, y la degradación efectiva de la proteína de las leguminosas grano testadas, guisante y altramuz.
2. Con la edad de las terneras, entre las 13 y las 41 semanas de vida, la actividad fermentativa se volvió más amilolítica, incrementando la concentración ruminal de ácidos grasos volátiles y la proporción relativa de propionato.
3. La velocidad de degradación y la degradabilidad efectiva de la proteína de la harina de girasol, del guisante y del altramuz, estimada *in situ*, se incrementó con la edad de las terneras, entre las 13 y las 41 semanas de vida.
4. Al estimar *in situ* la degradación de la proteína de suplementos proteicos de origen vegetal, en terneras al final de su cebo y consumiendo dietas con mucho concentrado, la proteína de la harina de girasol se degradó más y a mayor velocidad que la proteína de la harina de soja y de las leguminosas grano testadas, siendo los valores de degradación obtenidos más adecuados para dietas altas en concentrado.
5. *In vitro* la sincronización de la energía y la proteína tendió a aumentar la digestibilidad de la materia orgánica, la concentración de ácidos grasos volátiles y el flujo de nitrógeno microbiano. Sin embargo *in vivo* esta sincronización no se tradujo en diferencias en la fermentación ruminal ni en la digestibilidad de todo el tracto, sin mejorar los resultados productivos.
6. Descensos en el pH ruminal a valores de 5,8 durante 12 h al día, simulando una acidosis subclínica, no afectaron a la fermentación ruminal ni a la síntesis de proteína en el sistema *in vitro* de doble flujo continuo utilizado.

7. Si bien el uso de dietas sincronizadas no causó ningún efecto sobre la ingestión, ésta fue más elevada en las terneras que consumían maíz respecto a las que consumían cebada, sin que se afectara el crecimiento y empeorando el índice de conversión de las dietas que contenían maíz.
  
8. En la primera fase de cebo, entre los 130 y los 270 kg de peso vivo, consumiendo dietas muy fermentables a nivel ruminal, las terneras modularon la ingestión y el tiempo destinado a masticar, evitando así descensos importantes en el pH ruminal.