

# Degradabilidad ruminal *in situ* e *in vitro* de la metionina protegida

## *In situ* and *in vitro* degradability of rumen-protected methionine

Alejandro Lara Bueno<sup>a</sup>, Germán David Mendoza Martínez<sup>b</sup>, José Ricardo Bárcena Gama<sup>b</sup>, Luis León Landois Palencia<sup>b</sup>, María Teresa Sánchez-Torres Esqueda<sup>b</sup>, Carlos Miguel García Bojalil<sup>b</sup>, José Ayala Oseguera<sup>b</sup>

### RESUMEN

En dietas para rumiantes, los aminoácidos son rápidamente degradados por los microorganismos del rumen, por lo que se han protegido análogos de metionina (RPMet) a la degradación ruminal para incrementar el flujo del aminoácido al duodeno. Con el propósito de estimar la degradabilidad ruminal de un RPMet (Mepron<sup>®</sup>M85, Degussa-Hüls) se realizaron dos experimentos. En el Exp 1 se determinó la degradabilidad *in situ* del RPMet a 12, 18 y 24 h incubando el sustrato en el rumen de dos vacas con cánula ruminal. En el Exp 2, se realizaron cuatro determinaciones secuenciadas de degradabilidad *in vitro* a 12 y 18 h de incubación, utilizando como inóculo una mezcla de líquido ruminal de dos vacas adultas canuladas ruminalmente. Se encontraron diferencias en la degradabilidad del RPMet entre periodos de incubación ( $P < 0.01$ ) en ambos experimentos. La degradabilidad *in situ* de la materia seca (MS) y de PC del RPMet fueron 25.1 y 26.5, 40.7 y 43.0, 55.5 y 58.2 % a las 12, 18 y 24 h de incubación, respectivamente. La degradabilidad *in vitro* de MS y PC del RPMet fue 24.7 y 26.7, 36.5 y 35.1 % a las 12 y 18 h de incubación, respectivamente. La tasa de digestión del RPMet fue 3.3 % h<sup>-1</sup> para MS y 3.6 % h<sup>-1</sup> para PC. Los resultados indican que la metionina protegida tiene degradabilidad ruminal moderada a las 12 h de incubación, y ésta fue incrementada a más de 35 % después de 18 h de permanencia en el rumen.

**PALABRAS CLAVE:** Rumen, Metionina protegida, Degradabilidad *in situ*, Degradabilidad *in vitro*.

### ABSTRACT

Rumen microbes rapidly degrade amino acids in ruminant diets, and in response DL-methionine has been rumen-protected (RPMet) to increase duodenal digestible methionine. Two experiments were conducted to estimate rumen degradability of a commercial rumen-protected methionine (Mepron<sup>®</sup>M85, Degussa-Hüls). In the first experiment, *in situ* degradability of RPMet was determined at 12, 18 and 24 h using two cows fitted with rumen cannula. In the second experiment, *in vitro* degradability of RPMet at 12 and 18 h were replicated for four consecutive incubations using a mixture of rumen liquid from two cannulated cows as inoculum. Differences were recorded depending on incubation time ( $P < 0.01$ ) in both experiments. *In situ* degradability of RPMet dry matter was 25.1 % at 12 h incubation, 40.7 % at 18 h and 55.5 % at 24 h, while for RPMet crude protein it was 26.5 % at 12 h, 43.0 % at 18 h and 58.2 % at 24 h. *In vitro* degradability of RPMet dry matter was 24.7 % at 12 h incubation and 36.5 % at 18 h, while for RPMet crude protein it was 26.7 % at 12 h and 35.1 % 18 h. RPMet digestion rate at 24 h was 3.3 % h<sup>-1</sup> for dry matter and 3.6 % h<sup>-1</sup> for crude protein. Results indicate that rumen-protected methionine experiences moderate degradation at 12 h, though it can increase to more than 35 % after 18 h in the rumen.

**KEY WORDS:** Rumen, Ruminally-protected methionine, *In vitro* degradability, *In situ* degradability.

Los aminoácidos que llegan al intestino delgado del rumiante provienen de la proteína de origen microbiano, y la dietaria que escapa a la

The amino acids that arrive in the small intestine of ruminants come from the microbial and dietary protein that escapes degradation by rumen

Recibido el 17 de enero del 2001 y aceptado para su publicación el 23 de abril del 2002.

<sup>a</sup> Dirección de Centros Regionales Universitarios. Universidad Autónoma Chapingo. 56230 Chapingo, Edo. México. Tel-Fax: 015 954 6336 alarab\_11@hotmail.com

<sup>b</sup> Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Especialidad de Ganadería. Colegio de Postgraduados.

Este trabajo fue parcialmente financiado por Degussa-Hüls. Co.

degradación de los microorganismos del rumen, así como de aminoácidos de origen endógeno. Para aumentar la cantidad de aminoácidos que pueden ser absorbidos en el intestino delgado es conveniente incluir en la ración diaria fuentes de proteína de lenta degradación en el rumen, optimizar la fermentación ruminal y síntesis de proteína microbiana y suministrar aminoácidos que resistan la fermentación microbiana<sup>(1,2,3)</sup>. Entre los métodos que han sido utilizados para disminuir la degradabilidad microbiana de los aminoácidos e incrementar su flujo y disponibilidad en el intestino delgado están: el uso de aminoácidos e ingredientes proteínicos tratados químicamente<sup>(4)</sup>, tratados con calor<sup>(5)</sup>, y el uso de aminoácidos protegidos físicamente<sup>(6)</sup>, por lo que, varios aminoácidos de origen sintético, especialmente metionina, han sido valorados por su resistencia a la degradación ruminal<sup>(7,8,9)</sup>.

La metionina es un aminoácido esencial que limita el crecimiento y desarrollo corporal de los rumiantes jóvenes<sup>(10)</sup>, el rendimiento y calidad de la leche en vacas de alta producción<sup>(11)</sup> y la producción de lana en borregos<sup>(12)</sup>. Desafortunadamente, al igual que otros aminoácidos, la metionina es rápidamente oxidada y es utilizada para la síntesis de proteína de los microorganismos del rumen<sup>(12)</sup>. De este modo, cuando la metionina es ofrecida a través del alimento, la respuesta en la producción es variable debido a que la disponibilidad del aminoácido en el tracto bajo está limitada por la actividad de los microorganismos del rumen<sup>(13)</sup>. A pesar de los esfuerzos hechos para disminuir la degradabilidad ruminal de los aminoácidos que son ofrecidos en la dieta, la respuesta no ha sido siempre satisfactoria<sup>(14)</sup>; por ello, algunas investigaciones se han conducido para determinar la tasa de degradación ruminal y el flujo de aminoácidos (como la metionina y lisina) que sobrepasan el rumen<sup>(15,16,17)</sup>. El presente estudio fue diseñado para determinar la degradabilidad ruminal *in situ* e *in vitro* de un análogo de metionina protegida ruminalmente.

El RPMet utilizado (Mepron<sup>®</sup>M85, Degussa-Hüls) es un análogo de metionina, protegido físicamente por una película de etilcelulosa y ácido esteárico, capaz de resistir la acción fermentativa de los

microorganismos, as well as endogenous amino acids. To increase the quantity of amino acids that can be absorbed in the small intestine, protein sources with slow rumen degradation are added to the diet, both rumen fermentation and microbial protein synthesis are optimized, and amino acids are administered that resist microbial fermentation<sup>(1,2,3)</sup>. A number of methods have been used to decrease microbial degradation of amino acids and increase their flow and availability in the small intestine, including: chemically-treated amino acids and protein ingredients<sup>(4)</sup>; heat-treated amino acids and protein ingredients<sup>(5)</sup>; and physically-protected amino acids<sup>(6)</sup>. In response, the rumen degradation resistance of synthetic amino acids, and especially methionine, has been evaluated<sup>(7,8,9)</sup>.

Methionine is an essential amino acid that limits growth and body development in young ruminants<sup>(10)</sup>, milk yield and quality in high-production cows<sup>(11)</sup>, and wool production in sheep<sup>(12)</sup>. Like other amino acids, however, methionine is rapidly oxidized and used by rumen microorganisms for protein synthesis<sup>(12)</sup>. Thus, when methionine is given in the feed, the production response is variable because amino acids in the lower digestive tract are limited by rumen microorganism activity<sup>(13)</sup>. Despite efforts to diminish rumen degradability of amino acids offered in the feed, results have not always been satisfactory<sup>(14)</sup>. In response, some research has been focused on determining rumen degradation rate and the amino acid (e.g. methionine and lysine) flow that passes through the rumen<sup>(15,16,17)</sup>. The present study was designed to determine *in situ* and *in vitro* rumen degradability of a rumen-protected methionine (RPMet) analogue.

The rumen-protected methionine (RPMet) (Mepron<sup>®</sup>M85, Degussa-Hüls) used for this study is a methionine analogue that is physically protected by an ethylcellulose and stearic acid film. This enables the resistance of the fermenting action of the rumen microorganisms, but quickly disintegrates in the abomasum due to the acid pH environment. The commercial form comes in small 1.8 mm diameter by 2.5 to 4 mm long capsules containing 85 % DL-methionine synthesized from DL-2-

microorganismos del rumen, pero que se desintegra rápidamente en el abomaso por influencia del pH ácido. El producto comercial, presentado en forma de cápsulas pequeñas, tiene dimensiones de 1.8 mm de diámetro y 2.5 a 4 mm de largo; contiene 85 % de DL-metionina sintetizada a partir de ácido DL-2-hidroxi-4-metilbutanoico de calcio, el cual se absorbe por transporte activo en el intestino delgado<sup>(18)</sup>.

Dos vacas Holstein adultas (607 ± 65 kg de peso vivo), provistas de cánulas ruminales, fueron usadas para las incubaciones *in situ* y como donadoras del inóculo para el análisis *in vitro*. Las vacas se alojaron individualmente y se les ofreció alimento dos veces al día (0900 y 1600). La composición de la dieta fue: 48 % de rastrojo de maíz, 45 % de heno de alfalfa y 7 % de concentrado (Cuadro 1).

#### Experimento 1

La degradabilidad *in situ* del Mepron fue determinada mediante la técnica de incubación del sustrato en el rumen<sup>(22)</sup>. Los sustratos (tratamientos) analizados fueron: análogo de metionina ruminalmente protegida (RPMet), RPMet molido a 1 mm y harina de pasta de soya como testigo.

El propósito de moler el RPMet fue romper la cubierta protectora del producto, exponer la DL-metionina a la acción de los microorganismos del rumen y probar la eficacia de protección de las cápsulas intactas comparando la degradabilidad de la metionina del RPMet con la de la metionina liberada. Para ello, 5 g de RPMet, RPMet molido y pasta de soya, fueron colocados por duplicado en bolsas de polyester (15 x 7.5 cm de largo y ancho, respectivamente y 50 mm en diámetro de poro) e introducidos en el rumen de las vacas vía cánula ruminal por 12, 18 y 24 h (dos muestras por tratamiento para cada periodo de incubación). Adicionalmente, dos bolsas sin muestra (blancos) fueron introducidas en el rumen por 18 h, para un total de 20 bolsas por vaca<sup>(23)</sup>. Concluido el tiempo de permanencia del sustrato en el rumen, las bolsas fueron lavadas y secadas a peso constante. El sustrato residual de las bolsas fue analizado por el método macro Kjeldahl<sup>(19)</sup> para determinar el contenido de N remanente. La tasa de digestión del

hydroxy-4-calcium methylthiobutanoic acid, which is absorbed via active transport in the small intestine<sup>(18)</sup>.

Two adult Holstein cows (607 ± 65 kg live weight) fitted with rumen cannula were used for *in situ* incubations and as donors of inoculum for the *in vitro* analysis. The cows were kept separately and offered feed twice daily (0900 and 1600). Diet composition was 48 % corn wastes, 45 % alfalfa hay, and 7 % concentrate (Table 1).

#### Experiment 1

The *in situ* degradability of Mepron was determined using the rumen substrate incubation technique<sup>(22)</sup>. The analyzed substrates were rumen-protected methionine analogue (RPMet); RPMet ground to 1 mm size; and soybean meal as a control.

The RPMet was ground to break the product's protective cover and expose the DL-methionine to

Cuadro 1. Composición nutrimental de la dieta experimental (%)

Table 1. Nutritional composition of the experimental diet (%)

Component	Forage*	Supplement**	Total
Dry matter <sup>a</sup>	88.8	76.8	87.9
Crude protein <sup>a</sup>	9.8	44.6	12.2
Metabolizable energy <sup>b</sup> Mcal kg <sup>-1</sup>	1.9	3.3	2.0
Rumen-degradable protein <sup>b</sup>	74.1	34.7	71.3
Neutral detergent fiber <sup>c</sup>	53.3	13.2	52.8
Acidic detergent fiber <sup>c</sup>	35.0	5.4	33.9
Calcium <sup>b</sup>	0.97	0.30	0.92
Phosphorous <sup>b</sup>	0.17	0.30	0.18

\* Corn wastes (52 %) and alfalfa hay (48 %), processed to 3 cm size.

\*\* Molasses, wheat bran, blood meal, and vitamin and mineral pre-mix offered in multinutritional blocks.

a Analyzed with AOAC techniques<sup>(19)</sup>.

b Estimated from NRC tables<sup>(20)</sup>.

c Analyzed using technique of Van Soest *et al.*<sup>(21)</sup>.

RPMet, RPMet molido y pasta de soya fue estimada mediante la cinética de primer orden<sup>(24)</sup>.

### *Experimento 2*

Para determinar la degradabilidad ruminal del RPMet se realizaron cuatro corridas secuenciadas de digestibilidad *in vitro* para los tres sustratos usando la técnica propuesta por Tilley y Terry<sup>(25)</sup>. Las incubaciones dentro de cada corrida se hicieron en tubos de digestibilidad de 250 ml (dos tubos por sustrato para cada periodo de incubación) a los cuales se colocaron 60 mg de muestra, 150 ml de saliva de McDougall y 15 ml de líquido ruminal preparado previamente con bióxido de carbono para estabilizar el pH entre 6.8 y 7.0. Adicionalmente, tres tubos sin muestra (blancos), conteniendo saliva de McDougall y líquido ruminal, se incluyeron en cada corrida de incubación. Los tubos se cerraron con tapones de respiración, se colocaron en baño María a 39 °C y, protegidos de la luz, recibieron agitación lenta cada dos horas. La fermentación *in vitro* se interrumpió a las 12 y 18 h adicionando 1 ml de ácido clorhídrico concentrado a cada tubo. Después de la incubación, el contenido de cada tubo se filtró en papel filtro de poro grueso y el sustrato remanente se llevó a peso seco constante. Posteriormente, se determinó el contenido de N residual (método macro Kjeldahl) y se estimó la degradabilidad de la materia seca y de la proteína cruda ( $N \times 6.25$ ) de cada sustrato en cada periodo de incubación. Por diferencia entre la cantidad de N contenido en la muestra y del sustrato residual se estimó la cantidad de N desaparecido por gramo de muestra incubada. Adicionalmente, mediante las técnicas de AOAC<sup>(19)</sup> y de Van Soest *et al.*<sup>(21)</sup> se realizaron análisis de MS, FDN, FDA y cenizas, en periodos de 18 h de incubación.

Para el análisis y estimación de la degradabilidad de la metionina protegida en ambos experimentos se asumieron dos supuestos: primero, el contenido de NH<sub>3</sub>-H del RPMet y RPMet molido provino de la DL-metionina previamente encapsulada; segundo, el NH<sub>3</sub>-H remanente del RPMet incubado *in situ* correspondió totalmente a la DL-metionina residual. Supuestos como estos fueron considerados en estudios previos en los que se evaluó la eficiencia

rumen microorganism action. This was done to test the efficacy of the protection film on the intact capsules, and compare the degradability of the RPMet and the free methionine. For this comparison, 5 g each of RPMet, ground RPMet and soybean meal per duplicate were placed in polyester bags (15 cm long x 7.5 cm wide, with 50 mm pore diameter). Using a rumen cannula, the bags were then introduced into the cows for periods of 12, 18 and 24 hours, with two samples per treatment for each incubation period. Two blanks, i.e. bags without sample, were placed in the rumen for 18 h, bringing the total number of bags to 20 per cow<sup>(23)</sup>. Once the incubation time in the rumen was complete, the bags were washed and dried to constant weight. The residual substrate of the bags was analyzed with the macro Kjeldahl method<sup>(19)</sup> to determine remaining N content. The digestion rates for RPMet, ground RPMet and soybean meal were estimated using their first order kinetic<sup>(24)</sup>.

### *Experiment 2*

Using the technique proposed by Tilley and Terry<sup>(25)</sup>, four sequenced *in vitro* digestibility runs were done to determine RPMet rumen digestibility in the three substrates. The incubations within each run were done in 250 ml digestibility tubes, with two tubes per substrate per incubation period. Each tube contained 60 mg of sample, 150 ml McDougall's saliva, and 15 ml rumen liquid previously prepared with carbon dioxide to stabilize pH between 6.8 and 7.0. Three additional tubes containing McDougall's saliva and rumen liquid and no sample (blanks), were included in each run. All the tubes were closed with respiration caps, protected from light, and placed in a water bath at 39 °C under slow agitation for 2 h. The *in vitro* fermentation was interrupted at 12 and 18 h by adding 1 ml of concentrated hydrochloric acid to each tube. Once incubation was terminated, the contents of each tube were filtered through large-pore filter paper and the remaining substrate taken to constant dry weight. Residual N content was then determined (Kjeldahl macro-method) and the dry matter and crude protein ( $N \times 6.25$ ) degradability estimated for each substrate in each incubation period. The N content lost per gram of

de protección de la metionina protegida<sup>(8,26,27)</sup>. De este modo, la diferencia entre la concentración de NH<sub>3</sub>-H del sustrato incubado y el contenido de NH<sub>3</sub>-H de la muestra residual después del periodo de incubación, estimó la degradación de la metionina del RPMet y de la proteína (N x 6.25) de la pasta de soya.

Tanto *in situ* como *in vitro*, las variables degradabilidad de MS, PC y N desaparecido de la bolsa de polyester, del RPMet, RPMet molido y pasta de soya, se analizaron estadísticamente mediante un diseño en bloques completos aleatorizados con arreglo factorial 3x3, utilizando como criterio de bloque el animal fistulado (Exp 1) y la corrida en laboratorio (Exp 2), el tratamiento a tres niveles y el periodo de incubación a tres niveles.

El objetivo del experimento fue probar el efecto de la interacción entre el sustrato y periodo de incubación. Las medias de tratamiento para el respectivo periodo de incubación (interacción sustrato x tiempo de incubación) se estimaron mediante el procedimiento "lsmeans", mientras que las comparaciones entre las medias de mínimos cuadrados se analizaron con la instrucción "pdiff"<sup>(28)</sup>. Los efectos lineal y cuadrático del tiempo de incubación en la desaparición de MS, PC y N de cada sustrato *in situ* se probaron mediante contrastes ortogonales<sup>(29)</sup>. Con el propósito de normalizar los datos, se usó la transformación arcoseno de la raíz cuadrada de los valores porcentuales y se confirmó la distribución normal mediante la prueba de normalidad estadística de Shapiro-Wilk para los datos porcentuales ( $P < 0.05$ ) y los transformados ( $P < 0.01$ ) mediante la instrucción "univariate" de SAS<sup>(28,29)</sup>. Con el propósito de establecer la diferencia entre los valores de PC del RPMet obtenidos en laboratorio con el valor obtenido de fábrica, se utilizaron 10 determinaciones de PC (N x 6.25) del RPMet para construir un intervalo de confianza para la media de 99 %, previa transformación arcoseno de la raíz cuadrada de los valores porcentuales<sup>(29)</sup>. La tasa de digestión *in situ* de MS, PC y nitrógeno desaparecido de la bolsa de polyester, se obtuvieron mediante el modelo y procedimientos propuestos por Nocek y English<sup>(24)</sup> con la ecuación siguiente:

sample was estimated by calculating the difference between the sample N content and that of the residual substrate. Using the techniques of the AOAC and Van Soest *et al.*<sup>(21)</sup>, analyses were done for dry matter (DM), neutral detergent fiber (NDF), acidic detergent fiber (ADF) and ash in 18 h incubation periods.

Two assumptions were made in the protected methionine degradability analysis and estimation in both experiments: first, that RPMet and ground RPMet NH<sub>3</sub>-H content came from the encapsulated DL-methionine; and second, that the remnant NH<sub>3</sub>-H from the *in situ* incubated RPMet completely corresponded to residual DL-methionine. Similar assumptions have been used in previous studies evaluating the efficiency of the protection of protected methionine<sup>(8,26,27)</sup>. Using these assumptions, the degradation of the methionine in the RPMet and of the protein (N x 6.25) in the soybean meal were estimated using the difference between the NH<sub>3</sub>-H concentration of the incubated substrate and the NH<sub>3</sub>-H concentrations of the residual sample after the incubation period.

In both the *in situ* and *in vitro* analyses, the DM, CP and N degradability variables that disappeared from the bag, the RPMet, the ground RPMet and the soybean meal were statistically analyzed using a completely randomized block design with a 3x3 factorial arrangement. The fistulate animal (Exp 1), the laboratory run (Exp 2), the three-level treatment and the three-level incubation period were used as block criteria.

The experimental objective was to test the interaction between the substrate and incubation period. The treatment means for the respective incubation period (substrate interaction x incubation time) were estimated using the "lsmeans" procedure while the least squared means were analyzed with the "pdiff" command<sup>(28)</sup>. The linear and quadratic effects of incubation time in the disappearance of DM, CP and N in each *in situ* substrate were tested using orthogonal contrasts<sup>(29)</sup>. To normalize the data, the arcsine of the square root of the percentage values transformation was used, and normal distribution was confirmed using the Shapiro-Wilk

$$AR = -k t + R_0,$$

donde:

AR: es el logaritmo natural (Ln) del porcentaje de MS o PC residual;

-k: es la pendiente, la cual corresponde a la tasa de digestión;

t: es el tiempo de incubación y,

R<sub>0</sub>: es MS o PC residual al tiempo cero.

Se determinó la composición nutricional del RPMet mediante análisis en laboratorio de la proteína cruda (técnica macro Kjeldahl), fibra detergente neutro y fibra detergente ácido por el procedimiento de Van Soest *et al*<sup>(21)</sup> y humedad, fibra cruda, extracto etéreo y cenizas, mediante las técnicas propuestas por AOAC<sup>(19)</sup>. Los valores obtenidos fueron comparados con los estándares proporcionados por la empresa comercializadora del producto (Cuadro 2). El contenido de humedad, extracto etéreo y cenizas, fueron similares a los estándares comerciales del RPMet. Asimismo, el análisis de la fibra en las cápsulas de RPMet mostró valores de 4.8 y 2.7 % para FDN y FDA, respectivamente, lo cual indica que el producto puede tener digestibilidad alta al pasar por el tracto digestivo de los rumiantes. Por otro lado, el contenido de proteína cruda del RPMet fue de  $47.8 \pm 1.7$  % con un intervalo de confianza de ( $46.1 \geq \mu \leq 49.5$  %;  $n=10$ ,  $P<0.01$ ), cuyos valores son cercanos al porcentaje de PC obtenido de fábrica<sup>(30)</sup>. Asumiendo que todo el nitrógeno del RPMet provino de la metionina, el contenido del aminoácido se estimó en 81.3 %.

Degradabilidad *in situ*. Hubo diferencias significativas ( $P<0.01$ ) en la desaparición de MS y PC de la bolsa de polyester entre los periodos de incubación del RPMet y la pasta de soya (Cuadro 3). La degradabilidad de MS y PC del RPMet y de la pasta de soya se incrementó linealmente entre las 12 y 24 h de incubación ( $P<0.01$ ). La tasa de digestión del RPMet fue 3.3 % h<sup>-1</sup> para MS y 3.5 % h<sup>-1</sup> para PC. Del mismo modo, el N contenido en un gramo RPMet fermentado desapareció gradualmente de la bolsa de polyester en 3.55 mg g<sup>-1</sup> de MS h<sup>-1</sup> durante 24 h de

statistical normality test for the percentage ( $P<0.05$ ) and transformed ( $P<0.01$ ) values with the SAS “univariate” command<sup>(28,29)</sup>. For the purpose of establishing the difference between the RPMet CP values obtained in the laboratory and the value provided by the manufacturer, 10 determinations of the RPMet CP ( $N \times 6.25$ ) were used to build 99 % a confidence interval for the means, after arcsine square root transformation of the percent values<sup>(29)</sup>. The *in situ* digestion rate of the DM, CP and N lost from the polyester bag was obtained using Nocek and English's<sup>(24)</sup> model and proposed procedures with the following equation:

$$AR = -k t + R_0,$$

where:

AR: is the natural logarithm (Ln) of the percentage of residual DM and CP;

-k: is the slope, which corresponds to the digestion rate;

t: is incubation time; and

R<sub>0</sub>: is residual DM or CP at time zero.

The nutritional composition of RPMet was determined using laboratory analysis of crude

Cuadro 2. Composición química del RPMet, Mepron<sup>®</sup>M85, Degussa-Hüls (%)

Table 2. Chemical composition RPMet (Mepron<sup>®</sup>M85, Degussa-Hüls) (%)

Component	Manufacturer's standard*	Laboratory Analysis
Crude protein	50.0	47.8
DL-methionine	85.0	81.3
Moisture	1.0	0.8
Neutral detergent fiber	3.5	4.8
Acidic detergent fiber	2.5	2.7
Crude fiber	3.0	3.2
Ether extract	2.0	1.3
Ash	2.0	1.5
Lactation net energy (Mcal kg <sup>-1</sup> )	1.2	nd

\* Source: Degussa-Hüls<sup>(30)</sup>; nd= Not determined.

incubación. Sin embargo, la degradabilidad del RPMet molido fue 95 % de MS y más de 99 % de PC después de 12 h de permanencia en el rumen. De este modo, el N de la muestra de RPMet molido desapareció de la bolsa de polyester en una cantidad promedio de 20.91 mg g<sup>-1</sup> de MS h<sup>-1</sup> por cada gramo de sustrato degradado a 12 h de fermentación ruminal.

El tiempo Lag o de retraso, antes que los microorganismos del rumen iniciaran la degradación del sustrato a partir de la introducción de las bolsas al rumen, fue aproximadamente 1.3 h para el RPMet y prácticamente cero para el RPMet molido. Estos resultados muestran la pérdida de protección de la metionina contenida en el RPMet molido ya que, con el rompimiento de la cápsula de metionina, el aminoácido fue liberado y degradado, casi en su totalidad, durante las primeras 5 ó 6 h de fermentación ruminal (tasa de digestión de 20 % h<sup>-1</sup> o más), mientras que las cápsulas intactas de RPMet

protein (Kjeldahl macromethod); neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) were determined using the procedure of Van Soest *et al.*<sup>(21)</sup>; and humidity, crude fiber, ethereal extract, and ash content were determined using AOAC techniques<sup>(19)</sup>. The values were compared with the standards provided by the product manufacturer (Table 2).

Moisture content, ether extract and ash content of the tested RPMet were similar to the commercial standards. Fiber analysis of the RPMet capsules showed values of 4.8 % for NDF and 2.7 % for ADF, indicating that the product has high digestibility when passing through ruminant digestive tracts. Crude protein content for RPMet was 47.8 ± 1.7 % (confidence interval 46.1 ≥ μ ≤ 49.5 %; n=10, P<0.01), with values close to the CP percentage reported by the manufacturer<sup>(30)</sup>. Assuming that all RPMet nitrogen came from the methionine, the estimated amino acid content was 81.3 %.

Cuadro 3. Degradabilidad *in situ* de la materia seca (MS), proteína cruda (PC) y desaparición del nitrógeno (N), de la metionina protegida (RPMet), RPMet molida y pasta de soya

Table 3. *In situ* degradability of dry matter (DM), crude protein (CP) and nitrogen disappearance (N) of protected methionine (RPMet), ground RPMet and soybean meal

	Incubation period (h)			SE	Estimated parameters*				Contrast**, P<	
	12	18	24		DR	b	Lag	R <sup>2</sup>	L	C
RPMet										
DM, %	26.7 a	40.7 b	55.5 c	1.9	3.32	104.37	1.29	0.936	0.01	0.81
CP, %	26.5 a	43.0 b	58.2 c	1.5	3.57	104.65	1.27	0.944	0.01	0.74
N, mg g <sup>-1</sup>	20.2 a	32.7 b	44.3 c	1.2	3.55	97.99	1.26	0.944	0.01	0.74
Ground RPMet										
DM, %	95.6	95.3	94.9	0.1	12.78	56.92	-4.41	0.735	0.01	0.61
CP, %	99.8	99.8	99.6	0.1	25.01	32.15	-4.53	0.717	0.14	0.38
N, mg g <sup>-1</sup> DM	75.9	75.9	75.8	0.1	20.91	31.29	-4.27	0.745	0.14	0.38
Soybean meal										
DM, %	49.3 a	61.7 b	70.9 c	1.5	5.16	101.69	0.32	0.983	0.01	0.39
CP, %	36.7 a	48.7 b	66.0 c	2.9	4.37	103.51	0.79	0.929	0.01	0.48
N, mg g <sup>-1</sup> DM	27.7 a	36.7 b	49.8 c	2.2	4.37	78.99	0.76	0.932	0.01	0.48

\* DR= digestion rate; b= Y intercept; DM and CP lag time (h) estimated using equation: Lag= (Ln (100) - Ln (b))/ - (dr/100); N (mg g<sup>-1</sup> de DM) lag time (h) estimated with Ln of total N value of RPMet= 76.5 mg g<sup>-1</sup> of DM; and of soybean meal= 75.2 mg g<sup>-1</sup> of DM.

\*\*L= Linear effect; C= Quadratic effect.

SE= Standard error.

abc Values with different letters between incubation period are statistically different (P<0.01).

resistieron la actividad degradadora de los microorganismos del rumen, con una efectividad de protección de 75 % a 12 h de incubación. Estudios previos sobre la desaparición de la metionina del RPMet (65 a 85 % de DL-metionina) indican valores de 20 a 30 % durante las primeras 12 h de incubación<sup>(8,27,31)</sup>, lo cual concuerda con los valores de degradabilidad ruminal de la PC del RPMet obtenidos en el presente experimento. La desaparición de MS del RPMet de la bolsa de polyester, observada entre las 12 y 24 h en el presente estudio, fue similar a la mencionada por Koenig y Rode<sup>(32)</sup>, pero fue menor a los resultados obtenidos por otros investigadores<sup>(33)</sup>. La desaparición intraruminal de la proteína cruda del RPMet fue ligeramente mayor a la de MS. Overton *et al.*<sup>(31)</sup> observaron un incremento continuo en la desaparición *in situ* de la metionina del RPMet con valores de 21.8, 37.5 y 87.5 % después de 12, 24 y 96 h de incubación, respectivamente, mientras que otros investigadores<sup>(33)</sup> encontraron mayor degradabilidad de la metionina (36.7 y 46.1 % a las 12 y 16 h de incubación ruminal, respectivamente); sin embargo, debido a que el RPMet permanece poco tiempo en el rumen, otro reporte<sup>(30)</sup> sugiere que las incubaciones hechas por más de 12 h, valoran sólo la degradabilidad potencial del producto, sobrestimando la verdadera degradabilidad de la metionina.

La pasta de soya presentó mayor degradabilidad en el rumen que el RPMet. La desaparición *in situ* de

*In situ* degradability. There were significant differences ( $P < 0.01$ ) between the disappearance of DM and CP from the polyester bag between the RPMet and soybean meal incubations (Table 3). The DM and CP degradability of RPMet and soybean meal increased linearly between 12 and 24 h ( $P < 0.01$ ). The RPMet digestion rate was 3.3 % h<sup>-1</sup> for DM and 3.5 % h<sup>-1</sup> for CP. Nitrogen content per gram of fermented RPMet gradually disappeared from the polyester bag at a rate of 3.55 mg g<sup>-1</sup> of DM h<sup>-1</sup> during a 24 h incubation. In contrast, ground RPMet degradability was 95 % for DM and 99 % for CP after 12 h in the rumen. Likewise, nitrogen in the ground RPMet sample disappeared from the polyester bag at an average rate of 20.91 mg g<sup>-1</sup> of DM h<sup>-1</sup> per gram of degraded substrate in a 12 h rumen fermentation.

Lag time, or the delay before rumen microorganisms began substrate degradation from the moment the bags were introduced into the rumen, was approximately 1.3 h for RPMet and almost zero for ground RPMet. This demonstrates the loss of protection experienced by the ground RPMet as a result of breaking of the methionine capsule. In the ground RPMet, the amino acid was freed and almost totally degraded within the first 5 to 6 h of rumen fermentation (20 % h<sup>-1</sup> or more digestion rate), while the intact RPMet capsules resisted the degrading action of the rumen microorganisms with 75 % effectiveness for 12 h incubation. Previous studies of methionine disappearance from RPMet

Cuadro 4. Degradabilidad *in vitro* de la materia seca (MS), proteína cruda (PC) y desaparición del nitrógeno (N), de la metionina protegida (RPMet), RPMet molida y pasta de soya

Table 4. *In vitro* degradability of dry matter (DM), crude protein (CP) and nitrogen disappearance (N) of protected methionine (RPMet), ground RPMet and soybean meal

Incubation period (h):	RPMet		Ground RPMet		Soy Paste		SE
	12	18	12	18	12	18	
DM, %	24.7 <sup>a</sup>	36.5 <sup>b</sup>	98.7 <sup>c</sup>	98.5 <sup>c</sup>	50.4 <sup>d</sup>	59.5 <sup>e</sup>	1.2
CP, %	26.7 <sup>a</sup>	35.1 <sup>b</sup>	99.2 <sup>c</sup>	99.6 <sup>c</sup>	32.3 <sup>d</sup>	44.2 <sup>e</sup>	0.9
N, mg g <sup>-1</sup>	20.8 <sup>a</sup>	26.8 <sup>b</sup>	75.2 <sup>c</sup>	75.5 <sup>c</sup>	24.3 <sup>d</sup>	33.2 <sup>e</sup>	0.8

SE= Standard error.

abcde Values with different letters are different ( $P < 0.05$ ) between substrate and incubation period in each variable.



MS y PC contenidos en el sustrato testigo fue superior a 70 y 66 %, respectivamente, después de 24 h de incubación. La tasa de digestión de la pasta de soya fue 5.15 % h<sup>-1</sup> para MS y 4.37 % h<sup>-1</sup> para PC, mientras que el N de un gramo de pasta de soya desapareció 4.26 mg g<sup>-1</sup> de MS h<sup>-1</sup> durante el mismo periodo de incubación. Por otro lado, el tiempo Lag de la pasta de soya incubada fue cercano a cero, lo cual indica que la degradación de la materia seca y compuestos nitrogenados fue iniciada rápidamente.

En un estudio previo<sup>(34)</sup> se observó que la harina de soya disminuyó su solubilidad en agua y la tasa de desaparición de MS en el rumen pasó de 3.2 a 2.0 % h<sup>-1</sup> y 2.4 a 1.7 % h<sup>-1</sup> en periodos de incubación de 12 y 24 h, respectivamente, después de que, extraído el aceite con solventes, ésta fue tratada con calor. Estos autores mencionaron porcentajes de desaparición ruminal *in situ* de MS para la pasta de soya tratada vs pasta de soya no tratada de 57.2 vs 73.3, 65.7 vs 84.0 y 75.7 vs 92.2 después de 12, 18 y 24 h de incubación, respectivamente.

La tasa de digestión de la proteína de la pasta de soya observada en el presente experimento es similar a la tasa de digestión de varios concentrados proteínicos<sup>(35)</sup> y, aunque los valores son menores a los indicados por NRC<sup>(20)</sup> para la harina de soya extraída con solventes, también son mayores a los valores mencionados por Maiga *et al.*<sup>(34)</sup> para la pasta de soya extraída con solventes pero tratada con calor.

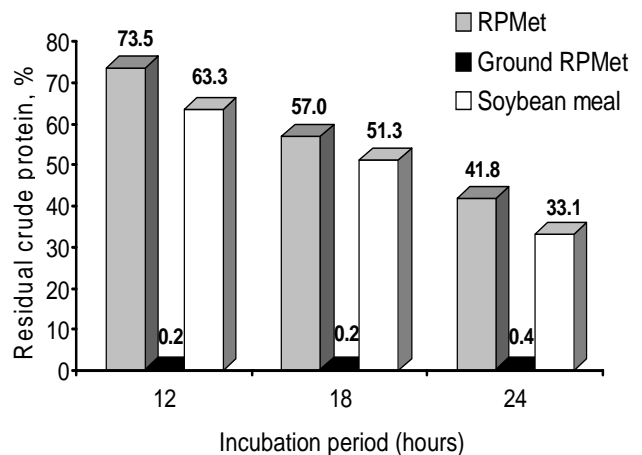
Degradabilidad *in vitro*. Los porcentajes de desaparición de MS, PC y N del RPMet, RPMet molido y pasta de soya a 12 y 18 h de incubación, utilizando liquido ruminal, se muestran en el Cuadro 4. Estos resultados confirman que el RPMet es degradado más lentamente que la metionina no protegida (RPMet molido) y que la pasta de soya. En concordancia con estos resultados, la degradación lenta de la metionina protegida en el rumen ha sido mencionada por otros investigadores. Así, la degradabilidad *in vitro* de un análogo de metionina protegida, obtenida por Papas *et al.*<sup>(36)</sup>, fue de hasta 40 % en un periodo de 18 h cuando

(65 to 85 % of DL-methionine) report values of 20 to 30 % for the first 12 h of incubation<sup>(8,27,31)</sup>, which agrees with the CP rumen degradation values obtained in the present study. The disappearance of DM from the polyester bag between 12 and 24 h recorded in the present study were similar to those reported by Koenig and Rode<sup>(32)</sup>, but less than results reported by other researchers<sup>(33)</sup>. Ruminal disappearance of CP from RPMet was slightly more than that for DM. Overton *et al.*<sup>(31)</sup> observed a continuous increase in *in situ* disappearance of methionine from RPMet with values of 21.8 % after 12 h of rumen incubation, 37.5 % after 24 h and 87.5 % after 96 h. Other researchers, however, have reported even greater methionine degradability, with values of 36.7 % after 12 h of rumen incubation and 46.1 % h after 16 h. It is important to take into account another report<sup>(30)</sup> with caution because RPMet remains in the rumen for only a short time, incubations of more than 12 h only evaluate the potential degradability of the product and overestimate real methionine degradability.

The soybean meal had greater rumen degradability than did the RPMet. The *in situ* disappearance of

Figura 1. Efectividad de protección ruminal *in situ* de la metionina protegida (RPMet), RPMet molida y pasta de soya

Figure 1. Effectiveness of *in situ* rumen protection of rumen-protected methionine (RPMet), ground RPMet and soybean meal



se utilizó un medio de incubación con pH de 4.1 a 4.3. También se menciona<sup>(7)</sup> que al menos el 70 % del contenido de un análogo de metionina protegida, permaneció en las cápsulas incubadas *in vitro* a 12 h, lo cual equivale al 30 % de degradabilidad ruminal durante ese periodo; estos mismos autores indicaron que la degradabilidad *in vitro* de la metionina no protegida (DL-metionina) fue 95 %, lo cual coincide con lo observado en el presente experimento cuando la metionina fue liberada de la cápsula protectora a través del molido.

*In vitro*, la degradabilidad de MS de la pasta de soya fue similar a la degradabilidad *in situ* a 12 y 18 h, respectivamente; sin embargo, la desaparición ruminal de la PC de la pasta de soya fue menor *in vitro* que *in situ*. Degradabilidad lenta de la proteína de la pasta de soya ha sido observada por efecto de sobrecalentamiento del grano de la soya durante el proceso industrial de extracción del aceite, proceso que pueden disminuir la solubilidad de la proteína e incrementar la protección de las cadenas polipeptídicas a la acción de los microorganismos del rumen<sup>(37,38)</sup>.

La efectividad de protección del RPMet, RPMet molido y pasta de soya fue también observada como resultado de las incubaciones *in situ* (Figura 1). La protección del RPMet disminuyó de 73.2 a 56.8 y a 41.2 % a 12, 18 y 24 h, respectivamente. La estabilidad en el rumen del RPMet ha sido analizada previamente durante las primeras 10 h de incubación, estableciéndose una protección superior a 80 %<sup>(30)</sup>. Incubaciones del RPMet por 6 h resultaron en una protección de 92 %<sup>(31)</sup> y 82 %<sup>(32)</sup> mientras que a 8-10 h la protección disminuyó a 68 %<sup>(33)</sup>. De este modo, cuando se analiza la efectividad de protección del RPMet antes de 12 h, es probable que se esté sobrestimando el flujo de las cápsulas que encierran a la metionina durante la permanencia de éstas en el rumen. Cuando las cápsulas de RPMet fueron rotas a través del molido, la estabilidad del análogo de metionina en la bolsa de polyester y en el líquido ruminal fue menor a 0.5 %, lo cual confirma la capacidad protectora de la película que conforma la cápsula de RPMet.

La proteína de la pasta de soya mostró menor estabilidad en el rumen que el RPMet a 12, 24 y

DM and CP contents in the control substrate was greater than 70 % for DM and 66 % for CP after 24 h incubation. Digestion rate of the soybean meal was 5.15 % h<sup>-1</sup> for DM and 4.37 % h<sup>-1</sup> for CP, while for the same period N in one gram of soybean meal disappeared at 4.26 mg g<sup>-1</sup> of DM h<sup>-1</sup>. Lag time for the incubated soybean meal was almost zero, which indicates that dry matter and nitrogenated compounds degradation began rapidly.

A previous study reports that, after its oils were extracted with solvents and it was heat-treated, soybean meal's water solubility decreased and its DM disappearance rate in the rumen decreased from 3.2 to 2.0 % h<sup>-1</sup> for a 12-h incubation and from 2.4 to 1.7 % h<sup>-1</sup> after 24 h. The reported *in situ* rumen disappearance percentages for treated vs untreated soybean meal were 57.2 vs 73.3 % at 12 h incubation, 65.7 vs 84.0 % at 18 h, and 75.7 vs 92.2 % at 24 h.

The protein digestion rate of the soybean meal observed in the present study was similar to the digestion rate of a number of protein concentrates<sup>(35)</sup>. Though these values are less than those reported for solvent-extracted soybean meal<sup>(20)</sup>, they are still greater than those reported for heat-treated, solvent-extracted soybean meal.<sup>(34)</sup>

*In vitro* degradability. Table 4 shows the disappearance percentages for the DM, CP and N of RPMet, ground RPMet and soybean meal, using rumen liquid, and at 12 and 18 h incubation. The results confirm that RPMet degrades more slowly than unprotected methionine (ground RPMet) and soybean meal, which agrees with the slow degradation reported for protected methionine by other researchers. Papas *et al.*<sup>(36)</sup> reported *in vitro* degradability for a protected methionine analogue up to 40 % in an 18 h period when 4.1 to 4.3 pH incubation medium is used. There are also reports<sup>(7)</sup> of 70 % of the protected methionine analogue remaining intact within the capsules *in vitro* for 12 h, which is equivalent to 30 % degradability for this period. This same study reports that *in vitro* degradability of unprotected (i.e. ground) methionine (DL-methionine) was 95 %, which coincides with the data from the present study.

18 h. Esto se debe a que la pasta de soya tiene alta solubilidad y los procedimientos para reducir la degradabilidad ruminal presentan resultados variables<sup>(38)</sup>; sin embargo, la protección de la proteína de la pasta de soya usada en el presente estudio fue mayor a lo que establece NRC<sup>(20)</sup>, lo cual supone sobreprotección de la fracción nitrogenada por sobrecalentamiento del sustrato.

Los resultados obtenidos sugieren que la degradabilidad ruminal del RPMet es de 25 % a 12 h de incubación y que ésta puede incrementarse a más de 40 o 55 % después de 18 ó 24 h de permanencia del sustrato en el rumen, respectivamente. La tasa de digestión de la proteína cruda del RPMet fue menor a la tasa de digestión de la proteína de la pasta de soya. La degradabilidad ruminal de la metionina no protegida (RPMet molido) fue prácticamente total a las 12 h, lo cual sugiere que la protección física del RPMet usado, lo hace altamente resistente a la acción de los microorganismos del rumen durante las primeras horas de incubación, lo cual se manifestó en la fase Lag. Tanto *in situ* como *in vitro*, la degradabilidad de la metionina a 18 h de incubación fue aumentada a más de 35 %, por lo que la efectividad de la protección del RPMet va a depender del tiempo de permanencia de las cápsulas de metionina en el rumen. Es importante realizar estudios sobre la efectividad de protección de los análogos de metionina que se utilizan en la alimentación de los rumiantes, para así poder definir y recomendar las dosis requeridas de RPMet que, sobrepasando el rumen, aporten la metionina digestible que puede ser absorbida en el duodeno.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece la donación del Mepron<sup>®</sup>M85 y el apoyo financiero parcial recibido por Degussa-Hüls en México, para la realización de esta investigación. A Magdalena Crosby y Andrés Lee por el apoyo técnico en los análisis realizados en el laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados.

*In vitro* DM degradability of soybean meal was similar to *in situ* degradability at 12 and 18 h incubation, though rumen disappearance of CP from the soybean meal was less during *in vitro* than during *in situ* incubation. Slow protein degradability in soybean meal has been observed as a result of overheating of the soybean grain during the industrial oil extraction process. This process can diminish protein solubility and increase the protection of the polypeptide chains against rumen microorganism action<sup>(37,38)</sup>.

The protection effectiveness of the RPMet versus the ground RPMet and soybean meal was also observed in the *in situ* incubations (Figure 1). The RPMet protection decreased from 73.2 % at 12 h to 56.8 % at 18 h and 42.2 % at 24 h incubation. Rumen stability of RPMet has also been analyzed in previous studies, with results ranging from over 80 % protection during the first 10 h of incubation<sup>(30)</sup>, to 92 %<sup>(31)</sup> and 82 %<sup>(32)</sup> after 6 h incubation, and decreasing to 68 % after 8 to 10 h incubation<sup>(33)</sup>. Given these results, when the effectiveness of RPMet protection is analyzed before 12 h, it is likely that the methionine-containing capsule flow is overestimated during its time in the rumen. When the RPMet capsules were ground to break the protecting capsule, methionine analogue stability in the polyester bag in rumen liquid was less than 0.5 %, which confirms the protective capacity of the film forming the RPMet capsule.

The soybean meal protein exhibited lower rumen stability that did RPMet at 12, 18 and 24 h incubation. This is due to soybean meal's high solubility and the variable results of procedures used to reduce its rumen degradability<sup>(38)</sup>. However, the protection of the soybean meal protein used in the present study was higher than that established by the NRC<sup>(20)</sup>, which supposes overprotection of the nitrogenated fraction via substrate overheating.

The results suggest that rumen degradability of RPMet is 25 % at 12 h incubation, and increases to more than 40 % after 18 h, and 55 % after 24 h substrate time in the rumen. The RPMet crude protein digestion rate was less than the soybean meal protein digestion rate. Rumen degradability

**LITERATURA CITADA**

1. Klopfenstein T, Stock R, Britton R. Relevance of bypass protein to cattle feeding. *Professional Anim Sci* 1985;1:27-31.
2. Chalupa W. Rumen bypass protection of proteins and amino acids. *J Dairy Sci* 1974;58:1198-1218.
3. Volden H, Velle W, Magne HO, Aulie A, Sjaastad OV. Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine and threonine administered intraruminally in mixtures to high-yielding cows. *J Anim Sci* 1998;76:1232-1240.
4. Broderick GA, Balthrop Jr JE. Chemical inhibition of amino acid deamination by ruminal microbes *in vitro*. *J Anim Sci* 1979;49:1101-1111.
5. Broderick GA, Craig WM. Effect of heat treatment on ruminal degradation and escape, and intestinal digestibility of cottonseed meal protein. *J Nutr* 1980;110:2381-2390.
6. Kung Jr L, Rode LM. Amino acid metabolism in ruminants. *Anim Feed Sci Technol* 1996;59:167-172.
7. Patterson JA, Kung Jr L. Metabolism of DL-methionine and methionine analogs by rumen microorganisms. *J Dairy Sci* 1988;71:3292-3301.
8. Bach A, Stern DM. Measuring resistance to ruminal degradation and bioavailability of ruminally protected methionine. *Anim Feed Sci Technol* 2000;84:23-32.
9. Robert JC, Williams PEV, Souza B. Influence of source of methionine and protection technology on the post ruminal delivery and supply to the blood of dairy cows of an oral supplement of methionine [abstract]. *J Dairy Sci* 1997;80(Suppl 1):248.
10. Merchen NR, Titgemeyer EC. Manipulation of amino acid supply to the growing ruminant. *J Anim Sci* 1992;70:3238-3247.
11. Hansen WP, Otterby DE, Linn JG, Donker JD. Influence of forage type, ratio of forage to concentrate and methionine hydroxy analog on performance of dairy cows. *J Dairy Sci* 1991;74:1361-1369.
12. Mata G, Masters DG, Buscall D, Street K, Schlink AC. Responses in wool growth, live weight, glutathione and amino acid in Merino weathers fed increasing amounts of methionine protected from degradation in the rumen. *Aust J Agric Res* 1995;46:1189-1204.
13. Onodera R. Methionine and lysine metabolism in the rumen and the possible effects of their metabolites on the nutrition and physiology of ruminants. *Amino Acids* 1993;5:217-232.
14. Rulquin H, Pisulewski PM, Verité R, Guinard J. Milk production and composition as a function of postruminal lysine and methionine supply: a nutrient-response approach. *Livest Prod Sci* 1993;37:69-90.
15. Emery RS. Disappearance of methionine from the rumen. *J Dairy Sci* 1971;54:1090-1099.
16. Cottle DJ, Velle W. Degradation and outflow of amino acids from the rumen of sheep. *Br J Nutr* 1989;61:397-408.
17. Schwab CG. Rumen-protected amino acids for dairy cattle: progress towards determining lysine and methionine requirements. *Anim Feed Sci Technol* 1996;59:87-101.
18. Greissinger D, Kniesel H, Heimbeck W, Tanner H. Active substance preparation for oral administration, especially to ruminants. Degussa AG, assignee. US Pat N° 5,279,832. 1994.
19. AOAC. Official methods of analysis. 15th ed. Arlington, VA, US. Association of Official Analytical Chemists. 1990.
20. NRC. National Research Council. The Nutrient requirements of dairy cattle 7<sup>a</sup> ed. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
21. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991;74:3583-3597.
22. Mehrez AZ, Orskov ER. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J Agric Sci Camb* 1977;88:645-650.
23. Romero F. Utilisation of the *in situ* digestion technique for forage characterisation. In: Ruiz ME, Ruiz SE, editors. Ruminant nutrition research: Methodological Guidelines. IICA-RISPAL, San José, Costa Rica. 1992;143-154
24. Nocek JE, English JE. *In situ* degradation kinetics: Evaluation of rate determination procedure. *J Dairy Sci* 1986;69:77-87.
25. Tilley JMA, Terry RA. A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *J Br Grassl Soc* 1963;18:104-111.
26. Huisman J, van Weerden EJ, van Leeuwen P, Koch F. Effect of methionine compounds on rumen activity of cows. *Netherl J Agr Sci* 1988;36:111-117.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Degussa-Hüls Mexico for its donation of Mepron<sup>®</sup>M85 and partial financial support of this research. Thanks are also due Magdalena Crosby and Andrés Lee for their technical support during laboratory analysis carried out in the Animal Nutrition Laboratory of the Colegio de Postgraduados.

*End of english version*

DEGRADABILIDAD RUMINAL *in situ* E *in vitro* DE LA METIONINA PROTEGIDA

27. Mbanzamihigo L, Vanduycke E, Demeyer DI. Degradation of methionine by rumen contents *in vitro* and efficiency of its protection. *Anim Feed Sci Technol* 1997;67:339-347.
28. SAS. SAS User's Guide Statistics. Statistics (version 8 ed.) Cary, NC, US. SAS Inst. Inc. 1999.
29. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2<sup>a</sup> ed. NY, US: McGraw-Hill Book Co; 1980.
30. Degussa. Degussa Corporation. The next advance in dairy nutrition: Methionine availability. Technical report No. 1-3. Arlington, IL, USA. 1996.
31. Overton TR, LaCount DW, Cicela TM, Clark JH. Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1996;79:631-638.
32. Koenig KM, Rode LM. Ruminal degradability, Intestinal disappearance, and plasma methionine response of rumen protected methionine in dairy cows. *J Dairy Sci* 2001;84:1480-1487.
33. Berthiaume R, Lapierre H, Stevenson M, Coté N, McBride BW. Comparison of the *in situ* and *in vivo* intestinal disappearance of ruminally protected methionine. *J Dairy Sci* 2000;83:2049-2056.
34. Maiga AH, Schingoethe DJ, Henson JE. Ruminal degradation, amino acid composition, and intestinal digestibility of the residual components of five protein supplements. *J Dairy Sci* 1996;79:1647-1653.
35. Ganev G, Orskov ER, Smart R. The effect of roughage or concentrate feeding and retention time on total degradation of protein in the rumen. *J Agric Sci Camb* 1979;90:647-655.
36. Papas AM, Sniffen CJ, Muscato TV. Effectiveness of rumen-protected methionine for delivering methionine postruminally in dairy cows. *J Dairy Sci* 1984;67:545-552.
37. Broderick GA. Relative value of solvent and expeller soybean meal for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1986;69:2948-2958.
38. Faldet MA, Voss VL, Broderick GA, Satter LD. Chemical, *in vitro*, and *in situ* evaluation of heat treated soybean proteins. *J Dairy Sci* 1991;74:2548-2554.

