

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA Y MATERIA ORGÁNICA EN EL RUMEN Y SU IMPORTANCIA EN RUMIANTES EN PASTOREO^a

Carlos Villalobos González^b
Eduardo González Valenzuela^c
José Alfonso Ortega Santos^c

RESUMEN

Villalobos GC, González VE, Ortega SJA. *Téc Pecu Méx* 2000;38(2):119-134. Tradicionalmente los requerimientos de proteína de los rumiantes se han expresado con base en la proteína cruda de la dieta. Aunque éste ha sido un sistema útil, no evalúa adecuadamente la disponibilidad de la proteína del suplemento y del pastizal. Por lo anterior se sugiere el uso de proteína metabolizable para fines de cálculos del aporte de proteína en la suplementación. Las estimaciones de la degradación de proteína cruda y materia orgánica por los microorganismos del rumen son difíciles. Las técnicas *in vivo*, normalmente se han considerado un estándar con las que se comparan las otras técnicas; sin embargo, este método requiere que se mantengan animales preparados quirúrgicamente. El problema que se ha encontrado con los métodos *in vitro* es que tienen muy poca relación con los métodos *in vivo*. Cuando se compara la degradabilidad de la proteína *in vivo* con las diferentes técnicas, la técnica *in situ* es la que ha proporcionado la mejor relación para determinar más correctamente la proteína degradable y la no degradable. Sin embargo, es necesaria más investigación para describir las fracciones de proteína que son degradadas y aquellas que no son degradadas en diferentes tipos de pastizales, para utilizar mejor el nuevo sistema de proteína.

PALABRAS CLAVE: Proteína, Materia orgánica, Degradación, Rumiantes, Pastoreo, Nitrógeno, Bolsas de nylon.

INTRODUCCIÓN

La producción ganadera en los pastizales nativos e introducidos, depende de la calidad y cantidad del forraje disponible. La mayoría de las zonas áridas y semiáridas tienen periodos definidos de sequía y

épocas invernales, durante las cuales la calidad y cantidad del forraje disponible disminuyen, especialmente el contenido de proteína cruda y la digestibilidad. Como consecuencia, se reduce el consumo de forraje, reflejándose en pérdidas de peso que disminuyen la producción.

^a Recibido el 10 de diciembre de 1999 y aceptado para su publicación el 8 de agosto de 2000.

^b Texas Tech University. Range, Wildlife and Fisheries Department. P. Box 42125. Lubbock, TX 79409-2125. E-mail: C.Villalobos.@ttu.edu

^c Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. CIR Noreste.

La suplementación de rumiantes en pastoreo en el invierno y en la época de sequía, es una práctica común de la ganadería extensiva del norte de México y suroeste de los Estados Unidos, y consiste

en ofrecer los nutrientes deficientes para llenar los requerimientos nutricionales. Se considera que los principales nutrientes deficientes en el norte de México durante la época de sequía o latencia son proteína, energía, fósforo y vitamina A; los periodos de suplementación varían debido a las condiciones climáticas de cada año, pero generalmente se inician en enero para terminar en mayo o junio⁽¹⁾.

Hay disponible una gran variedad de suplementos comerciales, los cuales comúnmente se preparan y se venden con base en el porcentaje de proteína cruda, y una de las principales fuentes es la harinolina. Aunque la suplementación de proteína es costosa, un gran número de productores sobrealimentan o subalimentan con suplementos proteicos; la principal razón es que no se conoce tanto la degradabilidad ruminal de varios suplementos así como la de la dieta consumida por los animales.

Tradicionalmente, los requerimientos de proteína de los rumiantes se han expresado con base en la proteína cruda de la dieta⁽²⁾; aunque éste ha sido un sistema útil, no evalúa adecuadamente las fuentes de proteína del suplemento y del pastizal. Es importante mencionar que, bajo cualquier programa de suplementación, la cantidad de proteína suplementada es el factor clave que determina la ganancia de cualquier operación bajo condiciones de pastoreo, especialmente con novillos de repasto, que es un sistema de producción común en el norte de México, y suroeste de Estados Unidos.

La publicación reciente de los requerimientos para ganado de carne del

NRC de los Estados Unidos⁽²⁾, utiliza el sistema de proteína metabolizable para calcular las necesidades de los animales. Los requerimientos de proteína para rumiantes normalmente se satisfacen por dos fuentes: la primera es la proteína de origen microbiano que está disponible a nivel post-ruminal y la segunda es la proteína de la dieta que escapa a la digestión ruminal, pero que es digerida en el intestino delgado. La proteína de sobrepaso puede provenir del forraje y/o del suplemento, y normalmente se conoce como proteína no degradable (PN), mientras que la proteína que es degradada en el rumen es conocida como proteína degradable (PD)⁽³⁾.

Para poder hacer uso de este nuevo sistema de suplementación de proteína, es necesario tener información acerca de la degradación ruminal de la proteína tanto del forraje (pastizal) como del suplemento. La degradación de la proteína en el rumen es uno de los factores básicos más importantes en los nuevos sistemas de evaluación de proteína^(2,4). Los sistemas recientes propuestos para calcular los requerimientos de proteína para rumiantes han reconocido la importancia de la degradación de la proteína en el rumen, como el principal factor que determina la proteína que se absorbe en el intestino delgado⁽⁴⁾. Los microorganismos del rumen utilizan proteína degradada para proporcionar amoniaco para la digestión de la fibra y para la síntesis de la proteína microbiana⁽⁵⁾.

El grado en que la proteína es degradada en el rumen depende de la actividad proteolítica de los microorganismos del rumen, del acceso de los microorganismos

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA EN EL RUMEN

hacia la proteína, y de la tasa de pasaje del alimento⁽⁵⁾. La proteína que pasa del rumen hacia el abomaso es comúnmente llamada proteína “sobrepasante”, o proteína no degradada, para que se pueda diferenciar de la proteína sintetizada por los microorganismos del rumen y de las secreciones endógenas. La proteína que pasa hacia el abomaso consiste de dos fracciones: la que resiste al ataque microbial en el rumen, y la proteína que evade el ataque en el rumen y pasa hacia el omaso sin degradarse.

La proteína que entra al rumen-retículo tiene la posibilidad de ser degradada por bacterias y protozoarios. La degradación básicamente involucra dos pasos: hidrólisis de la cadena péptida (proteólisis) para producir péptidos y aminoácidos, y deaminación y degradación de aminoácidos; después de la proteólisis, los péptidos o aminoácidos liberados pueden dejar el rumen-retículo, y ser utilizados para el crecimiento microbial, o pueden ser degradados a amoníaco y ácidos grasos volátiles. Los aminoácidos son rápidamente degradados en el rumen, por lo que pocos aminoácidos están disponibles para absorción o pasaje del rumen-retículo.

La degradación de proteína ha sido definida como una función del tiempo cuando se utilizan técnicas *in vitro*, *in situ* o enzimas proteolíticas. La mayoría de los datos se adaptan a un modelo general con tres fracciones: A= nnp (nitrógeno no proteico) o proteína que es degradada bastante rápido; B= proteína que es degradada a una velocidad similar a la tasa de pasaje y C= proteína no degradable o que puede ser degradada muy lentamente⁽⁴⁾.

El medir la degradación de proteína y materia orgánica por los microorganismos del rumen es difícil. Puede haber una gran variación en la degradación de la proteína entre y dentro de los mismos alimentos. Hay varias fuentes de error analítico, una de las más importantes es el distinguir entre proteína bacterial y la proteína que no es degradada. Dado que la degradabilidad de la proteína determina tanto la fracción degradada como la no degradada de la proteína de la dieta, la exactitud para estimar la degradación de la proteína de la dieta, es bastante importante en la implementación del nuevo sistema en la alimentación de rumiantes⁽⁶⁾.

El objetivo de esta revisión es analizar las ventajas y limitantes de las técnicas disponibles para evaluar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen de animales en pastoreo.

PROCEDIMIENTOS in vivo

Uno de los métodos más comunes para estimar la degradación de la proteína en el rumen es mediante la técnica *in vivo* (7,8,9,10,11,12,13,14,15,16); sin embargo, este método requiere mantener animales preparados quirúrgicamente, (en el rumen y duodeno) lo cual no es fácil, además de que exige una serie de análisis laboriosos. Otra dificultad es la separación de la proteína microbial y de la dieta⁽¹⁷⁾. Desafortunadamente, esta técnica es de utilidad con alimentos que tienen contenidos relativamente altos de proteína⁽⁴⁾, por lo tanto, sería inadecuada para forrajes provenientes de pastizales nativos durante la época de sequía o invierno.

PROCEDIMIENTOS in vitro

Solubilidad. El principio de estas determinaciones es la extracción del nitrógeno soluble en el alimento, con un solvente en un determinado período de tiempo⁽¹⁸⁾. La medición de la solubilidad de la proteína como indicador de la degradación en el rumen fue mencionado por Henderick y Martin⁽¹⁹⁾. La degradabilidad puede estar influenciada por varios factores asociados con el solvente y el procedimiento de extracción⁽¹⁸⁾. La razón principal de la poca relación entre la solubilidad y la degradación en el rumen se debe a una combinación de tres factores: 1) potencial de contaminación microbial del alimento no digerido, 2) las fracciones de N que varían considerablemente en su degradabilidad, y 3) la degradabilidad relacionada a la configuración y estructura de la proteína⁽²⁰⁾.

Producción de amoníaco. Un método común para estimar la degradación de proteína, incluye la incubación de la muestra en líquido ruminal y luego medir la producción de amoníaco⁽⁴⁾. Varios investigadores desarrollaron un método basado en medir la concentración de amoníaco y producción de gas cuando una muestra fue incubada en líquido ruminal⁽²¹⁾. Un aspecto muy importante en esta técnica es la fuente de carbohidratos utilizados en relación a la fuente de proteína en la evaluación de la producción de gas, sin embargo, la concentración de amoníaco y la producción de gas quizá no describan adecuadamente la degradación de la proteína *in vivo*. De hecho, el uso de esta técnica está limitada por las variaciones diarias en la concentración de

amoníaco en el líquido ruminal del animal donante, por la producción de amoníaco de otras fuentes fuera de la proteína del alimento, y por la utilización de amoníaco por la población microbial.

Enzimas proteolíticas. El uso de varias enzimas proteolíticas para estimar la solubilidad o insolubilidad de la proteína ha atraído un gran interés en los últimos años⁽¹⁸⁾. Nocek⁽²⁰⁾, mencionó que las técnicas que utilizan enzimas proteolíticas ofrecen grandes ventajas sobre los cultivos microbiales (bajo costo, menos tiempo, menos contaminación con residuos alimentarios, y no se necesitan animales fistulados). Sin embargo, Broderick⁽²²⁾ menciona que el utilizar proteasas comerciales con amplia especificidad, puede enmascarar los resultados entre diferentes alimentos en la susceptibilidad a la proteólisis en el rumen.

En general, los sistemas que utilizan enzimas proteolíticas tienen el potencial para estimar la digestión ruminal de la proteína; sin embargo, las fuentes potenciales de variación incluyen pH y duración de la incubación, condición de saturación de las enzimas y la temperatura⁽²⁰⁾.

La degradación de la proteína en el rumen está en función de la actividad proteolítica de la flora microbiana. McAllan y Smith⁽⁵⁾ han sugerido que las bacterias celulolíticas son parcialmente dependientes de los aminoácidos y péptidos pre-formados. Las fracciones que sean degradadas y que proporcionen sustratos adecuados podrían proporcionar una buena respuesta para el crecimiento bacterial.

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA EN EL RUMEN

Es sumamente difícil obtener valores de degradabilidad absoluta de la fuente de proteína de la dieta total⁽²³⁾, por lo que es más realista determinar valores de la proteína que es degradada y la que no es degradada en el rumen. Los valores de degradabilidad ruminal se verán afectados por las características del alimento en uso y por la presencia de los otros componentes de la dieta⁽²⁴⁾.

Para determinar más correctamente la proteína degradable y la no degradable de la fuente del alimento, los valores de degradabilidad deberán determinarse bajo las condiciones alimenticias y fisiológicas a las que van a ser aplicadas⁽²⁵⁾. En general es de esperarse que la técnica *in situ* sea más sensible a los cambios en las concentraciones ruminales de amoníaco que las técnicas *in vitro*. Por lo tanto, la técnica *in situ* tiene ventajas para utilizarse en pruebas o investigaciones de suplementación proteica⁽²⁶⁾.

PROCEDIMIENTOS in situ

Esta técnica funciona suspendiendo bolsas de nylon en el rumen, que contengan el tipo de muestras a las que se les tiene que determinar la desaparición de materia orgánica y proteína cruda a diferentes intervalos de tiempo⁽²⁷⁾. El nitrógeno que desaparece de las bolsas es equivalente a la proteína que es degradada⁽¹⁰⁾. La técnica *in situ*, proporciona información confiable acerca de las estimaciones de la degradabilidad *in vitro* para varios tipos de alimentos⁽¹¹⁾; sin embargo su popularidad ha estado sujeta a extensas críticas y evaluaciones.

Existe un gran número de factores que afectan la estimación de la degradabilidad en el rumen cuando se utiliza la técnica *in situ*, por lo tanto todos los factores que influyen deberán tomarse en cuenta cuando ésta se utilice⁽²⁰⁾. A continuación se mencionaran algunos de los factores que afectan los resultados obtenidos con la técnica *in situ*:

a) Porosidad de la bolsa. La selección de la porosidad de la bolsa se hará considerando el riesgo de perder partículas de la muestra, el grado de entrada de contenidos del rumen, limitaciones en la entrada y salida del líquido del rumen, y el riesgo de seleccionar diferentes poblaciones microbianas⁽¹⁸⁾. Las diferencias en la porosidad son especialmente notables después de 12 horas de incubación en el rumen. Sólo parte de estas diferencias pueden ser atribuidas a las variaciones en la pérdida de partículas causada por la apertura de la bolsa⁽¹⁸⁾. El límite de la porosidad de la bolsa es difícil de evaluar y depende del tamaño de partícula de la muestra, así como la naturaleza y el tipo de alimento que se va a evaluar. La porosidad (apertura de la bolsa) de 40 a 60 micras parece ser un punto adecuado con respecto al flujo microbial y de líquidos⁽¹⁸⁾.

b) Tamaño de muestra. Para decidir el tamaño de muestra se deben tomar en cuenta dos aspectos: una cantidad suficiente de muestra debe quedar para el análisis después de los periodos de incubación, pero la cantidad de la muestra no debe de ser tan grande para que retrase el mezclado instantáneo de las partículas del alimento y el líquido ruminal⁽¹⁸⁾. La relación del

tamaño de muestra al área de la bolsa también proporciona una medida del tamaño adecuado para comparaciones entre laboratorios⁽²⁰⁾.

El rango en el tamaño de muestra que deberá ser utilizada en relación a la superficie de la bolsa, que deberá ser de 10 a 20 mg/cm² para la mayoría de alimentos del tipo concentrados y forrajes⁽²⁰⁾. La cantidad exacta de muestra que debe ser incubada y el tamaño de la bolsa dependen del ingrediente en estudio y del tiempo total de incubación, lo mismo que del número de análisis químicos que se pretendan realizar con el residuo⁽²⁰⁾. Orskov *et al.*⁽²⁷⁾ sugieren que la cantidad de muestra incubada en la bolsa depende también de la densidad de la muestra. Generalmente 2 g de paja molida, 3 g de heno de buena calidad, 5 g de concentrados y 10-15 g de forraje fresco.

c) Tamaño de partícula de la muestra. La preparación de la muestra para la incubación es muy importante. Hasta donde sea posible, el material deberá aparecer en el rumen como éste es consumido por el animal⁽²⁷⁾; naturalmente, las variaciones en la porosidad de la bolsa afectan la degradación de la muestra, por lo que es necesario estandarizar el procedimiento de molido, para poder llevar a cabo comparaciones entre experimentos⁽¹⁸⁾.

Nocek⁽²⁰⁾ sugiere que se muelan los suplementos proteicos en una malla de 2 mm antes de la incubación, mientras que los forrajes (> 60% de materia seca) deberán molerse a través de una malla de 5 mm. El molido sirve también para uniformizar y reducir variación en el

muestreo y en la medición de la tasa de digestión.

d) Efectos de la dieta. La dieta puede tener un efecto definitivo en la tasa de degradación del material que es incubado; por ejemplo, en animales que son alimentados con una dieta alta en concentrados, la actividad de microorganismos que degradan la celulosa se reduce considerablemente⁽²⁷⁾. Dado que las muestras puestas en las bolsas de nylon están suspendidas en el rumen en contacto directo con la población microbiana del mismo, es muy probable que haya un efecto en la tasa y el grado de digestión de esa muestra⁽²⁰⁾.

La situación ideal para estimar la degradabilidad de cierto alimento, debería ser la más cercana a la dieta o al alimento en la cual se va a utilizar; sin embargo, esto no es posible en situaciones prácticas donde se maneja una gran cantidad de muestras⁽¹⁸⁾. En la dieta basal deberá incluirse un amplio rango de ingredientes, de esta manera se tomará una población microbiana diversa⁽²⁰⁾.

e) Contaminación microbiana. Uno de los problemas más serios de la técnica *in situ* es el medir el grado de la contaminación microbiana de los residuos incubados. Debido al íntimo contacto de las muestras con la microflora ruminal, la contaminación con constituyentes microbianos es un obstáculo irreversible, así como la fuente de variación asociada con la estimación real de la digestibilidad de los nutrientes analizados con la técnica *in situ*⁽²⁸⁾. En este contexto, por lo menos los forrajes toscos y de baja calidad deberán corregirse para contaminación microbiana. Aunque las

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA EN EL RUMEN

bolsas se laven bien, los residuos pueden contener cantidades importantes de material microbial.

Varios investigadores han usado diversas fuentes de nitrógeno bacterial como marcadores desde principios de los 1980's. Mathers y Aitchison⁽²⁹⁾, usaron ácido diaminopimélico (DAPA). Kennedy *et al.*,⁽³⁰⁾ usaron S₃₅ o N₁₅. La evaluación del contenido del nitrógeno bacterial en los residuos de muestras incubadas *in situ*, presentó una variación de acuerdo al tipo de marcador usado. Con S₃₅ se encontraron valores mayores que con N₁₅⁽³⁰⁾. Cuando se compararon los dos métodos, se encontró que ninguno fue estable y que puede haber más variación con el tiempo de incubación en el rumen⁽³⁰⁾. La colonización bacterial en el residuo se incrementa linealmente con el tiempo de incubación^(30,31,32,33). Estos datos sugieren que las bacterias normalmente se adhieren a partículas de la dieta hasta un tiempo determinado, después de esto, es función de sitio de adhesión disponible, o de la disponibilidad de substratos; además del tamaño de partículas, y del tamaño del poro de la bolsa⁽²⁰⁾.

El contenido total de nitrógeno en muestras de heno se incrementa gradualmente con el tiempo de incubación en el rumen, mientras que el contenido de fibra ácido detergente-nitrógeno (NFDA), permanece aproximadamente constante⁽³⁴⁾. En virtud de que el contenido de NFDA permanece aproximadamente constante, el total de nitrógeno que no se degrada puede ser calculado, definiendo un punto final de degradación. Así que es necesario dar suficiente tiempo de incubación a las

muestras, para detectar el punto final de la digestión⁽³³⁾. Como se mencionó, es sumamente difícil escoger el tiempo máximo de incubación. Se ha sugerido que el nitrógeno soluble-detergente ácido, puede usarse para estimar las fracciones no disponibles⁽³⁵⁾, y el residuo del nitrógeno potencialmente digestible puede ser obtenido al restar el nitrógeno soluble en detergente ácido (NSDA) del nitrógeno residual en las bolsas de nylon⁽³⁶⁾.

Anderson *et al.*⁽³⁷⁾ y Worrell *et al.*⁽³⁸⁾ desarrollaron una técnica usando NFDA como control para estimar cómo los microbios se adhieren, asumiendo que NFDA es indigestible. Por lo que los sitios de adherencia en la fibra control son similares a aquéllos en el forraje que se quiere analizar. De esta manera, se cree que los microbios se adhieren de igual manera tanto al forraje como a la fibra utilizada como control. El nitrógeno residual neto a cada tiempo de muestreo se determina restando el contenido de NFDA en cada una de las bolsas nylon, corregido por el contenido real de la fibra, humedad y NFDA, de cada una de las muestras de forraje o dietas⁽³⁷⁾.

f) Efecto del lavado. El lavado de las bolsas después de la incubación en el rumen tiene como objetivos principales detener la actividad microbial, y eliminar todas las partículas adheridas a la bolsa, debido al líquido ruminal⁽¹⁸⁾. El procedimiento estándar consiste en lavar las bolsas con agua de la llave, hasta que el agua salga clara de las bolsas, lo cual lleva aproximadamente 5 minutos por muestra⁽³⁹⁾. Nocek⁽²⁰⁾, concluye que es preferible arreglar el orden en que se

introduzcan las bolsas en el rumen, de forma que todas las bolsas puedan sacarse al mismo tiempo; esto permite que todas las bolsas se laven en menos tiempo.

Interpretación y descripción de la cinética de degradación y partículas en el rumen.

Los alimentos que son consumidos por los rumiantes se acumulan en el rumen, donde son fraccionados por mecanismos físicos, como la rumia; luego, los microorganismos del rumen los degradan y después de un período de estancia pasan del rumen al omaso a través del orificio retículo-omasal. La utilización de los nutrientes, especialmente la degradación de la proteína por los rumiantes en el caso de animales en pastoreo, está en función de estos procesos.

Los métodos *in vitro* e *in situ* han sido utilizados para determinar la tasa de degradación y para identificar las fracciones que son solubles o indigestibles para proteína, materia seca, materia orgánica y fibra^(40,41,28). En cuanto a la disponibilidad ruminal, existen al menos tres fracciones en las proteínas que pueden ser definidas como degradadas rápidamente, degradadas lentamente, y aquéllas que no se degradan. Estas son comúnmente conocidas como fracciones, A, B, y C respectivamente⁽¹⁷⁾. En el caso de la proteína, la fracción que es degradada rápidamente incluye no solamente nitrógeno no proteico, sino también proteína que es degradada rápidamente.

Existen varios modelos matemáticos para estimar estas fracciones^(42,43). La técnica de la bolsa de nylon (*in situ*) puede utilizarse para estimar las fracciones que son degradables en el rumen y aquéllas

que no lo son, así como para estimar la tasa de degradación de la proteína; sin embargo, la tasa de degradación de la fracción que es degradada rápidamente no puede estimarse con la técnica *in situ*, debido a que el tiempo de incubación en los estados iniciales de la degradación no es suficiente para estimar esta tasa con exactitud. Por otro lado, en la técnica *in situ*, se considera que la fracción soluble de nitrógeno es degradada; sin embargo, en algunas situaciones (forrajes tratados con amoníaco) la existencia de nitrógeno no digestible pero soluble conduce a mediciones erróneas en la degradabilidad del nitrógeno⁽⁴⁴⁾.

La fracción que es potencialmente degradada, normalmente se ha descrito como una constante cinética de primer orden^(42,45,46). La primera suposición es que los contenidos que se examinan son homogéneos y que el sustrato que queda será degradado como una función lineal de tiempo en el rumen (transformación logarítmica). Esta suposición básica no es válida cuando los contenidos solubles y los no solubles no son determinados, y tampoco restados de la secuencia de fermentación o cuando una mezcla de sustrato degradable heterogéneo (como en el caso de varios alimentos) es simultáneamente degradado a diferentes velocidades⁽²⁰⁾.

Los dos métodos más comunes para estimar la degradación del forraje son:

- 1) La parte soluble y la no soluble se determinan y se sustraen del nitrógeno residual del forraje, materia seca, o FDA, ya sea por medio de un análisis de regresión o el método de "pelado

de la curva". Este método puede llevarse a cabo si existe más de un componente lineal⁽³³⁾.

- 2) El modelo no lineal es también utilizado para describir la degradación de forraje. Este método se usa con⁽⁴⁷⁾, o sin tiempo de retraso⁽¹⁷⁾, y se ajusta hasta que el cambio en la suma de los cuadrados residuales, lleguen a un criterio de convergencia. La ventaja de este procedimiento es que todos los parámetros se calculan al mismo tiempo.

Nocek y English⁽³³⁾, compararon 4 métodos para estimar la tasa de degradación utilizando forrajes específicos, donde se conocía de antemano que tenían diferentes curvas de degradación. Dos de los cuatro métodos fueron aquéllos que se describieron previamente⁽⁴²⁾; uno de los métodos fue el de cuadrados mínimos no lineales, basado en el método de la estimación Marquardt's, y la transformación logarítmica sin corrección del residuo no degradable. El segundo método fue similar al primero, pero con corrección para el residuo no degradable. El tercer método fue el de "pelado de la curva" y el cuarto método fue el de los cuadrados mínimos no lineales⁽⁴⁸⁾.

Cuando los datos de transformación logarítmica se corrigieron con el residuo no degradado, estos valores fueron más comparables a los datos *in vivo*. Sin embargo, el uso de los modelos no lineales en comparación a la transformación logarítmica, no modifica la transformación de las fracciones del alimento, al menos cuando el tiempo de incubación es

suficiente para detectar correctamente el punto final de la degradación⁽⁴⁹⁾. Las fracciones de nitrógeno en el alimento normalmente no cambian en función del procedimiento utilizado para describir la tasa de degradación del nitrógeno, probablemente porque los parámetros de degradación están fuertemente correlacionados entre ellos⁽⁵⁰⁾.

UTILIZACIÓN DE PROTEÍNA POR LOS ANIMALES EN PASTOREO

Los requerimientos de proteína de los rumiantes se satisfacen por la proteína microbial y por la proteína que escapa de la degradación ruminal y que se absorbe en el intestino delgado⁽⁴⁾. Investigaciones recientes han ilustrado la importancia cualitativa de la proteína del forraje de los animales en pastoreo; algunos alimentos contienen proteína que se degrada considerablemente, mientras que otros proporcionan proteína de degradación lenta. Este concepto es lo que hace la expresión de proteína cruda una expresión sin lógica del valor protéico real.

La determinación de la degradación de la proteína en el rumen es sumamente importante para los sistemas de proteína metabolizable. Este sistema proporciona información de la proteína de la dieta que llega al intestino delgado y de la síntesis de proteína microbial⁽⁴⁾. La degradación de la proteína en el rumen es diferente entre alimentos debido a la tasa de proteólisis. Fuentes con tasas bajas de degradación, por ejemplo harina de sangre y harina de pescado, normalmente poseen tasas bajas de proteólisis después de un

incremento inmediato. En contraste, las fuentes de harinas de oleaginosas, como harina de soya y harinolina, son degradadas más rápidamente; por lo tanto la tasa de degradación es alta.

La liberación y subsecuente digestión de la proteína del forraje es dependiente de la interacción de varios procesos químicos y físicos. Se reconocen al menos cuatro clases de nitrógeno, con base en los criterios químicos y cinéticos: proteína soluble no nitrogenada, proteína de degradación rápida, proteína de degradación lenta, y nitrógeno no disponible⁽³⁵⁾.

El nivel de consumo de forraje probablemente tenga un efecto en la degradación de proteína, por el efecto en la tasa de pasaje. Los rumiantes altamente productivos consumen grandes cantidades de alimento; es muy probable que este tipo de animales tengan fracciones pequeñas de proteína que es degradada en el rumen. Zinn y Owens⁽⁵¹⁾, indican que el incremento en el consumo de forraje en novillos disminuyó la cantidad de proteína que fue degradada en el rumen; sin embargo, el efecto del consumo de forraje en el tiempo de retención ruminal puede ser pequeño⁽⁵²⁾ y quizá no cambie la tasa de degradación de la proteína en el rumen⁽⁵⁾.

ESTIMACIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE PROTEÍNA PARA GANADO DE CARNE EN AGOSTADEROS

En esta sección se presenta un ejemplo para determinar la cantidad de suplemento necesario, para llenar los requerimientos

de proteína degradable y no degradable de novillos y vacas en pastoreo. Algunas suposiciones deberán hacerse para calcular el consumo de forraje, digestibilidad y degradabilidad de la dieta y del suplemento. El Cuadro 1 muestra la estimación del consumo de forraje, ya sea para vacas lactantes o secas que reciben suplemento de proteína o energía. En general, se espera que se incremente el consumo de forraje en animales suplementados con proteína, y que no haya incremento en el consumo de forraje cuando se suplementa con energía. En este ejemplo, se calcularán los requerimientos de proteína degradable y no degradable de vacas gestantes de 544 kg pastoreando en un pastizal nativo.

1. Una vaca gestante de 544 kg consume 1.8% (base seca) del peso corporal cuando se utiliza una suplementación proteica (Cuadro 1); 544 kg peso corporal X 1.8 = 9.8 kg de materia seca/día.

9.8 kg de materia seca consumida X 0.45% TND (Total de nutrientes digestibles totales del pastizal nativo = 4.41 kg de TND consumido por día⁽⁵³⁾.

2. Requerimientos del consumo de proteína digestible son 11% del consumo de TND⁽⁵³⁾.

Consumo de 4.41 kg de TND x 0.11 = 0.485 kg requeridos de proteína digestible.

3. Qué proporciona el pastizal nativo?

9.8 kg de materia seca consumida X 4.0 % de proteína cruda en el pastizal = 0.392 kg de proteína cruda del forraje⁽⁵⁴⁾.

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA EN EL RUMEN

0.392 kg de proteína cruda del forraje X 0.50 proteína digestible = 0.196 kg de proteína digestible proporcionada por el forraje.

0.392 kg proteína cruda del forraje X 0.50 proteína no digestible = 0.196 kg de proteína sobrepasante.

El balance es = 0.485 kg requeridos - 0.196 kg proporcionados por el pastizal = 0.289 kg deficiente en proteína digestible.

4. Utilización de una fuente de suplementación proteica (harinolina) para llenar los requerimientos de proteína digestible.

0.289 kg deficiente en proteína digestible/ 0.60 proteína digestible en la harinolina = 0.481 kg proteína cruda de la harinolina.

0.481 kg/0.40 proteína cruda en la harinolina = 1.20 kg de harinolina

necesarios para llenar los requerimientos de proteína digestible.

5. Qué pasa con los requerimientos de proteína metabolizable?

a) 4.41 kg de TND proporcionado por el pastizal nativo X 0.11 (producción de proteína microbial) X 0.60 (absorción de proteína microbial) = 0.290 kg de proteína microbial (proteína metabolizable) proporcionada.

b) 1.20 kg de suplemento de harinolina X 0.30 (proteína degradable en la harinolina) X 0.70 (absorción de la proteína de la harinolina) = 0.252 kg de proteína metabolizable de la harinolina.

c) 0.196 kg de proteína no degradable X 0.37 = 0.066 kg de proteína metabolizable del pastizal nativo⁽⁵⁴⁾.

Cuadro 1. Estimación del consumo de forraje* de vacas en diferentes estados fisiológicos, consumiendo forraje de buena o mala calidad y suplementadas con energía o proteína

	Vacas Gestantes	Vacas Lactantes
Forraje de baja calidad		
Sin suplemento	1.5	2.0
Suplementación de proteína	1.8	2.2
Suplementación de energía	1.5	2.0
Forraje de buena calidad		
Sin suplemento	2.0	2.3
Suplementación de proteína	2.2	2.5
Suplementación de energía	2.0	2.3

Cochrab, R.C.⁽⁵³⁾

* Porcentaje del peso vivo

d) Cálculo de los requerimientos de proteína metabolizable para vacas gestantes:

Requerimientos de proteína metabolizable para una vaca de 544 kg = 500 g/día:

0.290 kg de proteína metabolizable microbial,

0.252 kg de proteína metabolizable de la harinolina,

0.066 kg de proteína metabolizable del pastizal nativo,

0.608 kg de proteína metabolizable proporcionada por la dieta, harinolina y proteína microbial.

Estos valores, indican que es adecuado calcular la proteína metabolizable de esta manera. Algunas estimaciones de degradación de proteína en algunos suplementos se pueden encontrar en algunas publicaciones^(2,4), sin embargo, es necesario más investigación para describir las fracciones de proteína que son degradadas y aquéllas que no son degradadas en diferentes tipos de pastizal, para una mejor utilización del nuevo sistema de evaluación de proteína.

DISCUSIÓN

La evaluación de la cantidad de proteína y materia orgánica que los microorganismos del rumen degradan, es muy importante para calcular la proteína a suplementar. De la misma forma, estos cálculos ayudan a determinar si la suplementación de energía o proteína es necesaria utilizando la relación energía/proteína^(55,56). Sin embargo, es conveniente conocer las ventajas y desventajas que ofrece cada una de las técnicas disponibles.

Debemos de recordar que los microorganismos del rumen necesitan un balance (sincronización) de energía y proteína, y la forma de evaluarlo es por medio de la relación materia orgánica digestible y proteína. En este caso el porcentaje de materia orgánica digestible (MOD) representa la energía digestible contra el porcentaje de proteína del forraje. De acuerdo a NRC⁽⁴⁾, los microbios del rumen requieren la relación de MOD:proteína que sea alrededor de 6:1. Esta tasa o relación puede ser utilizada para decidir cuándo la suplementación de proteína y energía será benéfica. Si esta tasa se incrementa, la cantidad de energía disponible para los microorganismos ruminales excede la cantidad de proteína disponible y limita la actividad microbial. Muchos investigadores están utilizando una relación entre 6-7:1 como regla^(55,56). Si un forraje tiene una relación mayor de 6-7 lo que normalmente resulta es una fermentación ruminal no óptima, en consecuencia reducirá el consumo de forraje, y será necesaria la suplementación de proteína. Si un forraje tiene una tasa entre 2-5:1, normalmente se considera alto en proteína pero carece de energía. De esta manera una pequeña cantidad de energía puede modificar esta relación hacia lo óptimo.

Las técnicas *in vivo*, normalmente se han considerado estándar para determinar tanto la degradación de proteína como de materia orgánica, con las cuales las otras técnicas se han comparado. El problema que se ha encontrado con los métodos *in vitro* es que tienen una relación muy baja con los métodos *in vivo*. La técnica de la solubilidad presentó una relación muy baja

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA EN EL RUMEN

comparada con la técnica *in vivo* cuando se usa con un amplio rango de alimentos y tiempos largos de incubación^(15,16).

Cuando se compara la degradabilidad de proteína con diferentes técnicas, la técnica *in situ* es la que ha proporcionado la mejor relación. En general es de esperarse que la técnica *in situ* sea más sensible a los cambios en las concentraciones ruminales de amoníaco que las técnicas *in vitro*. Por lo tanto, la técnica *in situ* es la más conveniente, en pruebas o investigaciones de suplementación proteica^(26,54,55,56). Sin embargo, como ya se mencionó existen

numerosos factores que afectan a los resultados de degradación obtenidos con esta técnica.

Para realizar una comparación entre laboratorios, es necesario estandarizar los factores conocidos que afectan esta técnica. Algunas sugerencias para su estandarización se mencionan en el Cuadro 2; desde luego que algunas de estas sugerencias no pueden ser aplicadas en animales en pastoreo. Con la estandarización de esta técnica y el uso de muestras de referencia, que ayuden a tomar en cuenta la variación debida a la población microbial, se

Cuadro 2. Sugerencias propuestas para estandarizar algunos factores que afectan la técnica *in situ*

	Recomendación
Dieta	
Tipo	60 a 70% de forraje
Nivel de alimentación	Mantenimiento
Frecuencia de alimentación	= veces/día
Bolsas	
Material	Polyester (nylon)
Tamaño de poro	40 a 60 microns
Relacion tamaño muestra: área superficial	10 mg/cm ²
Procesado de la muestra	malla de 2-mm (molino wiley)
Repeticiones	
Número de animales	=2
Número de días	=2
Número de bolsas	=1
Procedimiento de incubación	
Pre-incubación	No necesario
posición ruminal	Parte ventral del rumen
Inserción/remover	Remover simultáneamente
Tiempo de incubación	Tiempo necesario para describir la curva
Lavado	Lavadora (5 veces a 1 min/lavado)
Correccion microbial	Necesario
Modelo matemático	El modelo mas simple disponible
Substrato estándar	Necesario

esperaría que se incrementara la precisión de los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios. En la actualidad, la carencia de estandarización en las técnicas de lavado y la inhabilidad para corregir la contaminación microbial de los residuos, parecen ser las fuentes más importantes de variación con esta técnica.

TECHNIQUES FOR ESTIMATION OF DIETARY NITROGEN AND ORGANIC MATTER DEGRADABILITY IN THE RUMEN OF GRAZING RUMINANTS: A REVIEW

ABSTRACT

Villalobos GC, González VE, Ortega SJA. *Téc Pecu Méx.* 2000;38(2):119-134. Traditionally, ruminant protein requirements have been derived based upon the crude protein content of the diet. This system has been useful, but has failed to adequately evaluate available protein from the forage and from the supplement. As a result, it has been suggested to use a metabolizable protein system when calculating protein contents. Estimating crude protein and organic matter degradability from rumen microorganisms activity turns out to be difficult. *In vivo* techniques have been used as a standard to compare to other techniques. However, this procedure requires keeping surgically-prepared animals. One of the problems posed by *in vitro* techniques has been their poor relationship to the *in vivo* techniques. When comparing *in vivo* protein degradability to different techniques, the *in situ* procedure is the one that has offered the best relationship to determine the degradable and non-degradable protein. On the other hand, more research is needed to better describe degradable and non-degradable protein fractions in different kinds of rangelands to properly use the new protein system.

KEY WORDS: Ruminants, Digestion, Solubility, Nitrogen, Nylon bags, Grazing ruminants.

LITERATURA CITADA

1. Fierro LC. *Nutrición animal bajo condiciones de libre pastoreo.* Serie Técnico-Científica. Depto. de Manejo de Pastizales. INIP-SARH.1980;1(2).
2. NRC. National Research Council. *The Nutrient Requirements of Beef Cattle.* 7th ed. Washington, DC, US: National Academy Press; 1996.
3. Paterson J, Cochran R, Klopffstein T. Degradable and undegradable protein responses of cattle consuming forage-based diets. *Pro Grazing Livestock Nutrition Conference.* 1996. P-94-103.
4. NRC. *Rumen nitrogen usage.* Washington, DC. National Academy Press; 1985.
5. McAllan AB, Smith RH. Estimation of flows of organic matter and nitrogen components in post-ruminal digesta and effects of level of dietary intake and physical form of protein supplement on such estimates. *Br J Nutr* 1983;49:119.
6. Ha JK, Kennelly JJ. *In situ* dry matter and protein degradation of various protein sources in dairy cattle. *Can J Anim Sci* 1984;64:443.
7. Chalupa W. Rumen by-pass and protection of proteins and amino acids. *J Dairy Sci* 1974;58:1198.
8. Broderick GA. *In vitro* procedures for estimating rates of ruminal protein degradation and proportions of protein escaping the rumen undegraded. *J Nutr* 1978;108:181.
9. Zinn RA, Bull LS, Hemken RW. Degradation of supplemental proteins in the rumen. *J Anim Sci* 1981;52:857.
10. Broderick GA. Estimation of protein degradation using *in situ* and *in vitro* methods. In: Owens FN editors. *Protein requirements for cattle: Proc International Symposium.* Stillwater, Okla. Division of Agriculture, Oklahoma State University. 1982: MP-109:72
11. Stern MD, Satter LD. *In vivo* estimation of protein degradability in the rumen. In: Owens FN editors. *Protein requirements for cattle: Proc International Symposium.* Stillwater, Okla. Division of Agriculture, Oklahoma State University. 1982;MP-109.
12. Santos KA, Stern MD, Satter LD. Protein degradation in the rumen and amino acids absorption in the small intestine of lactating dairy cattle fed various protein sources. *J Anim Sci* 1984;58:244.
13. Prange RW, Stern MD, Jorgensen NA, Satter LD. Site and extent of protein digestion in lactating cows fed alfalfa silage or barley hay. *J Dairy Sci* 1984;67:2308.

TÉCNICAS PARA ESTIMAR LA DEGRADACIÓN DE PROTEÍNA EN EL RUMEN

14. Madsen J, Hvelplund T. Protein degradation in the rumen. A comparison between *in vivo*, nylon bag, *in vitro*, and buffer measurements. *Acta Agric Scand Suppl* 1985;25:103.
15. Ha JK, Kennelly JJ. Effect of dietary nitrogen source on microbial protein synthesis, dietary protein degradation and nutrient digestion in steers. *Anim Feed Sci Technol* 1986;14:117.
16. Garrett JE, Goodrich RD, Meiske JE, Stern MD. Influence of supplemental nitrogen source on digestion of nitrogen, dry matter and organic matter and *in vivo* rate of ruminal protein degradation. *J Anim Sci* 1987;64:1801.
17. Orskov ER, McDonald I. The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J Agric Sci (Camb)* 1979;92:499.
18. Lindberg JE. Estimation of ruminen degradability of feed proteins with *in sacco* technique and various *in vitro* methods: A Review. *Acta Agric Scand Suppl* 1985;25:64.
19. Henderick H, Martin J. *In vitro* study of the nitrogen metabolism in the rumen. *IRSIA C.R. Rech.*31; 1963.
20. Nocek, JE. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J Dairy Sci* 1988;71:2051.
21. Raab L, Cafantaris BT, Menke KM. Rumen protein degradation and biosynthesis. 1.A New method for determination of protein degradation in the rumen fluid *in vitro*. *Br J Nutr* 1983;50:569.
22. Broderick GA. Kinetics of protein degradation in the rumen. In: Friedman M editor. *Absorption and utilization of Amino Acids*. Vol. III. Boca Raton, FL, US: CRC, Press; 1990.
23. Stern MD, Satter LD. Evaluation of nitrogen solubility and the dacron bag technique as methods for estimating protein degradation in the rumen. *J Anim Sci* 1984;58:714.
24. Loerch SC, Berger LL, Gianola D, Fahey Jr GC. Effects of dietary protein source and energy level on *in situ* nitrogen disappearance of various protein sources. *J Anim Sci* 1983;56:206.
25. Kirkpatrick BK, Kennelly JJ. *In situ* degradability of protein and dry matter from single protein sources and from a total diet. *J Anim Sci* 1987;65:567.
26. Caton JS. Influence of protein supplementation on ruminal and cecal fermentation and digesta kinetics in steers grazing dormant blue grama rangeland and sheep fed low-quality hay [tesis doctoral] Las Cruces, NM New Mexico State Univ, 1987.
27. Orskov ER, Deb Hovell FD, Mould F. The use of the nylon bag technique for evaluation of feedstuffs. *Trop Anim Prod* 1980;5:195.
28. Nocek JE, Grant AL. Characterization of *in situ* nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages. *J Anim Sci* 1987;64:552.
29. Mathers JC, Aitchison EM. Direct estimation of the extent of contamination of food residues by microbial matter after incubation within synthetic fibre bags in the rumen. *J Agric Sci (Camb)* 1981;96:691.
30. Kennedy PM, Hazlewood GP, Milligan LP. A comparison of methods for the estimation of the proportion of microbial nitrogen in duodenal digesta, and of correction for microbial contamination in nylon bags incubated in the rumen of sheep. *Br J Nutr* 1984;52:403.
31. Nocek JE. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J Anim Sci* 1985;60:1347.
32. Nocek JE. Characterization of *in situ* dry matter and nitrogen of various corn grain forms. *J Dairy Sci* 1987;70:2291.
33. Nocek JE, English JE. *In situ* digestion kinetics: evaluation of rate determination procedures. *J Dairy Sci* 1986;69:77.
34. Lindberg JE, Varvikko T. The effect of bag pore size on the ruminal degradation of dry matter nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. *Swed. J Agric Res* 1982;12:163.
35. Pinchard GR, Van Soest PJ. Protein solubility of ruminant feeds. *Proc Cornell Nutr Conf* 1977;91-98.
36. Krishnamoorthy U, Sniffen CJ, Stern MD, Van Soest PV. Evaluation of mathematical model of rumen digestion in an *in vitro* simulation of rumen proteolysis to estimate the rumen-undegraded nitrogen content of feedstuffs. *Br J Nutr* 1983;50:555.
37. Anderson SJ, Klopffstein TJ, Wilkerson VA. Escape protein supplementation of yearling steers grazing smooth brome pastures. *J Anim Sci* 1988;66:237.
38. Worrell MA, Undersander DJ, Thompson CE, Bridges WC. Effects of time of season and cottonseed meal and lasalocid supplementation on steers grazing rye pastures. *J Anim Sci* 1990;68:1151.
39. Kempton TJ. The use of nylon bags to characterize the potential degradability of feeds for ruminants. *Trop Anim Prod* 1980;5:107.
40. Smith LH, Goering HK, Gordon CH. Relationship of forage compositions with rates of cell wall

- digestion and indigestibility of cell walls. *J Dairy Sci* 1971;55:1140.
41. Weakley DC, Stern MD, Satter LD. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. *J Anim Sci* 1983;56:493.
 42. Mertens DR, Loften JR. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. *J Dairy Sci* 1980;63:1437.
 43. Mertens D. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *J Anim Sci* 1987;64:1548.
 44. Van Soest PJ, Mason VC. The influence of the Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1991;32:45.
 45. Van Soest PJ, Sniffen CJ, Mertens DR, Fox DG, Robinson PH, Krishnamoorthy U. A net protein system for cattle: The rumen submodel for nitrogen. In: Protein requirements for cattle: Symposium. Oklahoma State Univ Stillwater. 1982; MP-1099:265.
 46. Mertens DR, Ely LO. Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization: A dynamic model evaluation. *J Anim Sci* 1982;54:895.
 47. Dhanoa MS. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass Forage Sci* 1988;43:441.
 48. Shipley RA, Clark RE. Tracer methods for *in vivo* kinetics: theory and applications. New York, US: Academic Press; 1972.
 49. Doreau MB, Ould-BAH MY. *In vitro* and *in sacco* methods for estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: A review. *Animal Feed Sci Technol* 1992;40:57.
 50. Denham SC, Morantes GA, Bates DB, Moore JE. Comparison of two models used to estimate *in situ* nitrogen disappearance. *J Dairy Sci* 1989;72:708.
 51. Zinn RA, Owens FN. Site of protein digestion in steers: predictability. *J Anim Sci* 1983;56:707.
 52. Varga GA, Prigge EC. Influence of forage species and level of intake on ruminal turnover rates. *J Anim Sci* 1982;55:1498.
 53. Cochran RC. Developing optimal supplementation programs for range livestock. In: 50 years of range research revisited. KSU Range Field Day. Manhattan, KS, US:1995.
 54. Villalobos JC. Effects of protein supplementation to steers grazing dormant tobosagrass [tesis doctoral] Texas Tech University, Lubbock, TX, US:1995.
 55. Villalobos JC, Britton CM, Wester DB. Predicting stocker average daily gain on tobosagrass range using digestible organic matter to crude protein ratio. Nutritional ecology of herbivores. Fifth International symposium on the nutrition of herbivores. Stone G, Forbes TDA, Stuth JW, Byers FM editors. San Antonio, Texas, US:1999.
 56. Villalobos JC. Interrelación de suplementos proteicos y energéticos con la calidad del forraje de animales en pastoreo. VIII Congreso internacional de nutrición animal. Chihuahua, Chih. 2000:3-44.