

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

ESCUELA DE ZOOTECNIA

Efecto de dos niveles de proteína cruda y suplementación con hidroxianálogo de metionina en el desempeño productivo de vacas lecheras

Omar Andrés Vargas Villalobos

Tesis presentada para optar por el título en el grado académico de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2014

Esta tesis, fue aceptada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Zootecnia de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agronómica con énfasis en Zootecnia.

Ph.D. Jorge Alberto Elizondo Salazar

Director de tesis

M.Sc. Augusto Rojas Bourrillón

Miembro del Tribunal

Lic. Oscar Cambroner Castro

Miembro del Tribunal

Lic. Alejandro Saborío Montero

Miembro del Tribunal

MSc. Andrea Brenes Soto

Directora de la Escuela a.i

Bach. Omar A. Vargas Villalobos

Sustentante

DEDICATORIA

El presente documento se lo dedico a mi familia. A mi padre Omar Vargas y mi madre Olga Villalobos, por todo el esfuerzo y sacrificio que juntos hemos hecho para sacar adelante, no solo este proyecto, sino por todos los años de estudio que han estado presentes. A mis tres hermanas, Viviana, Gloriana e Irina, por el apoyo y amor que me han ofrecido, y a mi sobrino Isaac quién siempre me alegra y motiva.

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios por la oportunidad de realizar y concluir este trabajo. También se le extiende un profundo y sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Al Dr. Jorge Elizondo Salazar por todo el apoyo ofrecido durante los años de estudio, por la confianza depositada para llevar a cabo este ensayo y motivación para seguir aprendiendo.

Al Ing. Mario Blanco Villalobos, propietario de la lechería en la cual se llevó a cabo este ensayo y a sus trabajadores, por haber facilitado el lugar, animales y condiciones necesarias para realizarlo y por la amabilidad ofrecida.

Al Ing. Oscar Cambroner Castro y al departamento de investigación comercial de FARYVET, por el apoyo, atención y recursos ofrecidos a lo largo del período.

ÍNDICE DE CONTENIDO

APROBACIÓN.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
RESUMEN	viii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos	3
ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO	3
Metabolismo de nitrógeno y proteína dietética	3
Fraccionamiento de proteínas	4
Necesidades de aminoácidos.....	6
Deficiencia de metionina	7
Aminoácidos sintéticos.....	8
Degradación, absorción y metabolismo de aminoácidos sintéticos.....	10
Respuesta en producción ante el uso de metionina sintética.....	12
Eficiencia de nitrógeno ante el uso de AA sintéticos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Composición de las dietas.....	16
Unidad experimental	17
Muestreo y análisis.....	17
Descripción del modelo estadístico	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20

Composición de la dieta	20
Respuesta en producción láctea	22
Producción y composición de grasa láctea	25
Producción y composición de proteína láctea	27
Adición de HMTBA y excreción de nitrógeno (NUL).....	29
Análisis de factibilidad	30
CONCLUSIONES.....	31
RECOMENDACIONES	32
LITERATURA CITADA.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aporte de lisina y metionina de algunas materias primas utilizadas en la nutrición de ganado lechero.....	8
Cuadro 2. Estructura de DL-metionina e hidroxianálogo de metionina.	10
Cuadro 3. Composición química de las materias primas utilizadas.....	17
Cuadro 4. Composición química de las dietas.	21
Cuadro 5. Aporte de HMTBA en el mejoramiento de AA metabolizable.	22
Cuadro 6. Efecto de la dieta en producción de leche y componentes lácteos.	23
Cuadro 7. Relación energía proteína de las dietas.	29
Cuadro 8. Análisis de costos: beneficio.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de flujo de N en el rumen (NRC 1985).	5
Figura 2. Efecto de suplementación HMTBA sobre la producción leche corregida a 4% grasa basado en la fórmula (0,4 x Kg de leche + 15 x Kg grasa), en los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFP TM , NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFP TM , NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).....	24
Figura 3. Efecto de suplementación HMTBA sobre el contenido de grasa láctea a) y rendimiento de grasa láctea b), en los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFP TM , NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFP TM , NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).	26
Figura 4. Efecto de suplementación HMTBA sobre el contenido de proteína láctea a) y rendimiento de proteína láctea b), en los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFP TM , NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC (15,8% PC + 25g de MFP TM , NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).	28

RESUMEN

Veinte vacas multíparas de la raza Holstein, con un promedio 138 ± 11 días de lactancia, $33,3 \pm 3,67$ kg de leche y $656,83 \pm 46,05$ kg de peso vivo (PV), fueron agrupadas de acuerdo a días de lactancia y número de parto. Dos niveles de proteína cruda en la dieta (estándar 15,8% y alto 16,6%) con o sin suplementación de hidroxianálogo de metionina HMTBA (25 g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA) fueron estudiados en un arreglo factorial 2 x 2. Producción láctea, composición láctea y nitrógeno ureico en leche (NUL) fueron determinados. Adicionar HMTBA permite incrementar la metionina metabolizable de 2,19% a 2,70% y 2,10% a 2,55% en los niveles estándar y alto de proteína cruda. No se observaron interacciones entre el nivel de proteína cruda y suplementación de HMTBA. No se observaron diferencias significativas en producción leche, ni leche corregida al 4% de grasa. Sin embargo la producción de leche corregida al 4% de grasa incrementó de 26,15 kg a 27,43 kg en el nivel estándar de proteína cruda y disminuyó de 32,93 kg a 30,40 kg en el nivel alto de proteína cruda. No se observó diferencias significativas en la composición y producción de grasa y proteína láctea en ambos niveles de proteína cruda. Sin embargo se obtuvo una tendencia positiva ($P < 0,10$) en composición de grasa y proteína láctea al adicionar el aditivo al nivel estándar de proteína cruda. La concentración de proteína láctea incrementó de 2,87% a 2,96% con 15,8% PC y disminuyó de 2,98% a 2,88% con 16,6% de PC. La concentración de grasa láctea incrementó de 3,21% a 3,56% y disminuyó de 3,21% a 3,14% conforme incrementó el nivel de proteína cruda en la dieta. Alimentar las vacas con alto nivel de proteína cruda incrementó significativamente ($P < 0,05$) el valor de NUL de 18,33 a 20,70 mg/dL. No se encontraron diferencias en el valor de NUL al adicionar HMTBA ($P > 0,05$). Ampliar el número de repeticiones así como el período de experimentación es necesario para confirmar el efecto positivo de HMTBA sobre niveles estándar de PC en vacas lecheras.

INTRODUCCIÓN

Por muchos años se ha hecho uso de la proteína cruda (PC) y proteína degradable (PDR) y no degradable (PNDR) en el rumen como indicadores en el balance nutricional de este nutriente, sin conocer si realmente la cantidad de proteína suministrada satisface las necesidades de aminoácidos (AA) para las etapas productivas de la vaca lechera. Esta práctica puede provocar excesos en la cantidad de nitrógeno (N) suministrado, lo que puede ser perjudicial para el medio ambiente y costoso para los productores (Edmunds et al. 2012).

Desde hace más de 26 años, investigadores han demostrado que la metionina (Met) y lisina (Lis) se consideran los aminoácidos esenciales para la síntesis de leche y la síntesis de proteína láctea en vacas altas productoras (Patterson y Kung 1988, Piepenbrink et al. 1996, Xu et al. 1998, Chen et al. 2011). Lo anterior debido a que el porcentaje de Lis y Met excretado por la glándula mamaria es mayor que los otros aminoácidos (Bremmer et al. 1997). También Patterson y Kung (1988) señalan que la Met posee una alta tasa de degradabilidad en el rumen por los microorganismos.

Por otra parte el NRC (2001) y Chen et al. (2011) mencionan que la lisina se identificó como el primer AA limitante para terneros recién destetados, ganado en desarrollo y vacas lactantes, cuando los alimentos a base de maíz y derivados de éste proveían la mayoría de proteína en la dieta. En contraste la metionina se considera limitante en estas etapas cuando la dieta se compone de pequeñas cantidades de maíz, altas cantidades de forrajes o cuando las fuentes de proteína de sobrepaso se componen de productos derivados de la soya o proteínas de origen animal.

Por lo tanto la suplementación de metionina para mejorar el perfil de AA esenciales, es fundamental para minimizar los niveles de PC y proteína de sobrepaso (RUP), lo que maximiza el desempeño en la lactancia y disminuye la

excreción de nitrógeno (Leonardi et al. 2003, Chen et al. 2011). De esta manera se reducen los costos de alimentación y contaminación ambiental.

Actualmente existen diversos tipos de aminoácidos sintéticos que han sido creados con el objetivo de evitar la degradación ruminal, lograr un impacto a nivel intestinal y suplir las deficiencias del requerimiento. Uno de los más estudiados en rumiantes ha sido el D L isómero ácido 2-hidroxi 1-4-metiltio butanóico (HMTBA), el cual posee la característica de no contribuir con N sobre el requerimiento del animal (Wittcoff et al. 2013).

El HMTBA contiene 84% de Met, una vez adicionada e ingerida el 60% será utilizada en el rumen donde estimulará la síntesis de proteína microbial, el 40% del remanente abandonará el rumen con la fase líquida de la ingesta y será absorbida por difusión a lo largo del tracto digestivo (Klangnok et al. 2011). El resultado más consistente de utilizar HMTBA en vacas lecheras ha sido el incremento en el contenido de grasa láctea (Zanton et al. 2014), y no tanto en el incremento en la concentración de proteína láctea (St-Pierre y Sylvester 2005).

Por lo tanto incrementar la cantidad de sólidos totales en leche, al suministrar fuentes de metionina inertes al rumen en forma de hidroxianálogos de metionina o metionina protegida, se presenta como una alternativa viable, lo que a su vez permite el balance de raciones bajas en proteína cruda.

Por consiguiente este trabajo posee como objetivo medir el desempeño productivo en vacas lactantes ante dos dietas, alta y baja en proteína cruda dietética y el suministro de hidroxianálogo de metionina (HMTBA), para cuantificar la producción láctea, la respuesta en producción de sólidos totales y medir la excreción de nitrógeno ureico en leche.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Medir el desempeño productivo en vacas lactantes ante dos dietas, alta y baja en proteína y el suministro de hidroxianálogo de metionina (HMTBA).

Objetivos. Específicos:

1. Cuantificar la producción láctea en dos dietas, alta y baja en proteína, ante el suministro de HMTBA.
2. Cuantificar la respuesta en producción de sólidos totales en dos dietas, alta y baja en proteína, ante el suministro de HMTBA.
3. Medir la excreción de nitrógeno (NUL) en dos dietas, alta y baja en proteína, ante el suministro de HMTBA.

ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Metabolismo de nitrógeno y proteína dietética

La proteína dietética generalmente se refiere a la proteína cruda (PC), la cual se define para los alimentos como el contenido de nitrógeno (N) X 6,25. Basándose en la suposición que el promedio de nitrógeno contenido en los alimentos es 16 g por 100 g de proteína. El contenido de proteína cruda calculada incluye el nitrógeno proteico y nitrógeno no proteico (NNP). Los alimentos varían ampliamente en sus relativas proporciones de proteína y NNP (NRC 2001).

Biológicamente los polímeros de proteínas consisten en AA unidos por enlaces covalentes, se considera de que manera la posición de cada aminoácido en la larga hilera que constituye la proteína determina la forma tridimensional, una estructura estabilizada por interacciones no covalentes entre las distintas partes de la molécula (Alberts et al. 2004).

El rumiante necesita de fuentes nitrogenadas para proveer el amoníaco que necesita la flora y fauna para producir proteína microbial una vez acoplado con la cantidad adecuada de energía. De esta manera la proteína microbial, PNDR, y nitrógeno endógeno componen la proteína metabolizable (NRC 2001).

Por lo tanto la proteína metabolizable se define como la proteína verdadera que es digerida post ruminal y el componente de aminoácido (AA) absorbido por el intestino. Los AA no son proteínas *per se*, pero son el nutriente requerido,

utilizado para construir bloques para la síntesis de proteínas, vitales para mantenimiento, crecimiento, reproducción y lactancia del ganado lechero (NRC 2001).

Las plantas, a diferencia de los rumiantes, si pueden capturar el nitrógeno atmosférico con o sin intervención microbial. Las bacterias en el rumen pueden provocar que el NNP (principalmente como amoniaco) sea capturado en proteína bacterial. Esta proteína será posteriormente digerida por el animal y será usada para suplir las necesidades de aminoácidos para la producción, deposición de proteína láctea, lana o tejidos animales o fecales (NRC 1985).

La proteína que ingresa al rumen posee tres destinos: es degradada a amoniaco y usada para la síntesis de proteína bacterial, abandona el rumen como amoniaco y es convertida a urea en el hígado, o escapa de la degradación microbiana convirtiéndola en proteína metabolizable (Van Amburgh et al. 2010).

Todos los rumiantes son obligatoriamente recicladores de nitrógeno y la cantidad reciclada está en función de su ingesta, la tasa de degradación de carbohidratos y proteínas, y la asociación microbial captada del alimento (Van Amburgh et al. 2010). El metabolismo de proteínas en el rumen se esquematiza en la Figura 1.

Fraccionamiento de proteínas

El modelo de fraccionamiento de proteínas permite conocer la separación de la proteína dietética y predecir su dinámica digestiva, así como evaluar las alternativas de diseño para mejorar su adecuación en predicción de la proteína degradable en rumen (PDR) y proteína de sobrepaso (PNRD). Este esquema fracciona la proteína cruda en 5 segmentos (A, B₁, B₂, B₃, C), basada en la solubilidad de proteínas en agentes precipitantes, buffers y soluciones detergentes (Chalupa y Sniffen 1996).

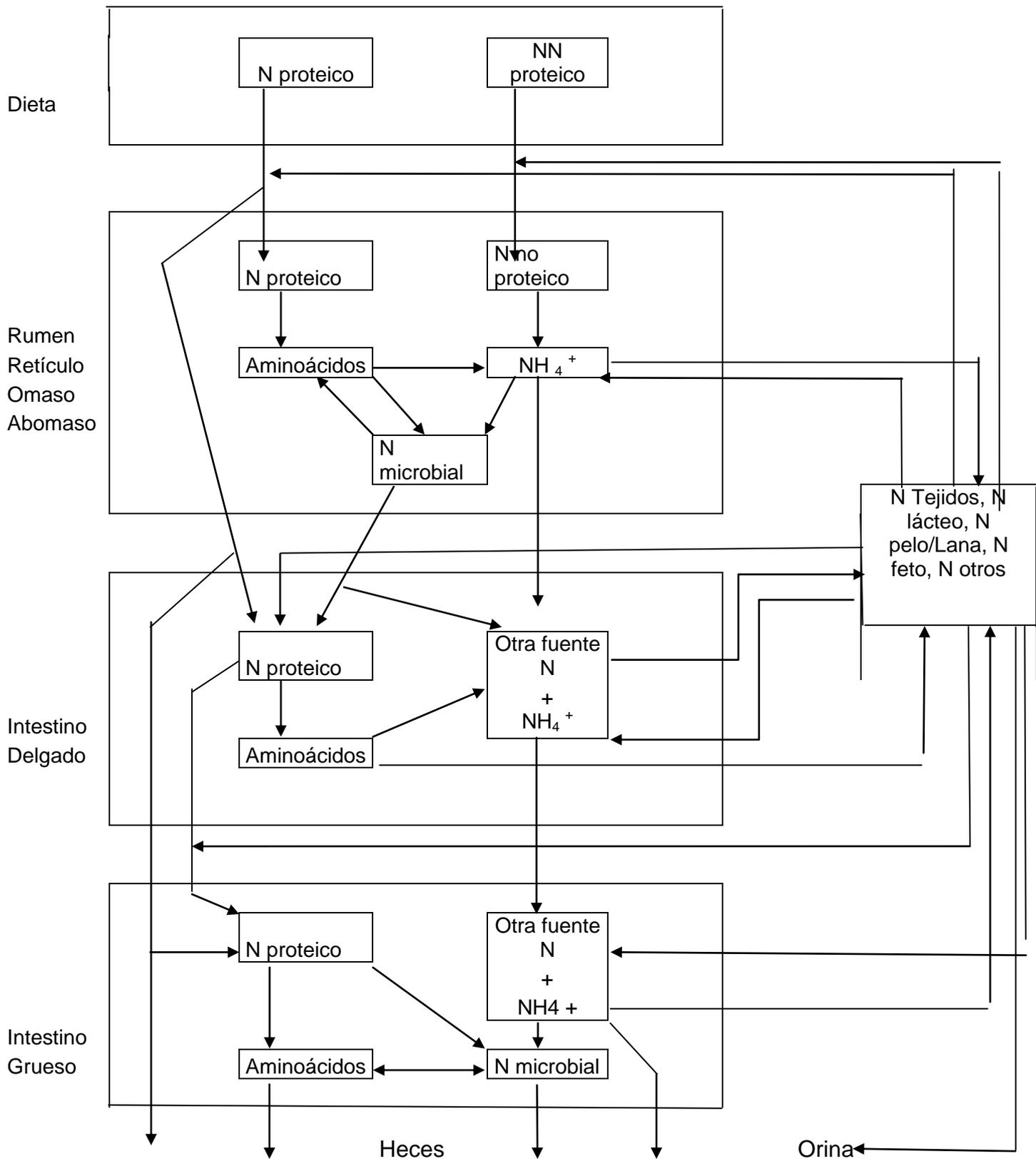


Figura 1. Esquema de flujo de N en el rumen, Adaptado de (NRC 1985).

La fracción A representa el nitrógeno no proteico soluble, B₁ es la fracción soluble de proteína verdadera y se caracteriza por poseer una degradabilidad ruminal 200 a 300%/hora, B₂ representa la proteína con tasas intermedias de degradación, posee una degradabilidad ruminal del 5-15%/hora y una degradabilidad intestinal del 100%, B₃ es la proteína soluble en detergente neutro pero soluble en detergente ácida, posee una degradabilidad ruminal del 0,1 a 1,5%/hora y una degradabilidad intestinal del 80% y C es la proteína indisponible tanto en rumen como intestino (Lanzas et al. 2008).

Necesidades de aminoácidos

Existe un patrón ideal de aminoácidos absorbidos para cada una de las funciones fisiológicas (NRC 2001). Los animales superiores requieren un núcleo de nueve aminoácidos para mantenimiento y propósitos productivos: lisina, histidina, leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina, triptofano y fenilalanina (D' Mello 2003). La necesidad para estos aminoácidos surge de la inhabilidad de todos los animales para sintetizar el correspondiente esqueleto de carbono o ceto acido. Los animales no rumiantes recibirán estos aminoácidos vía dieta, pero los rumiantes pueden también adquirir cantidades substanciales de estos AA a través de la digestión de microorganismos sintetizados en el rumen.

La absorción de AA provista por la síntesis de proteína microbial, proteína de sobrepaso y nitrógeno endógeno son esenciales para la construcción de tejido y proteína láctea, así como en menor medida, también se requieren AA para la síntesis de otros metabolitos del cuerpo (NRC 2001). La metionina es importante para producir formilmetionina (fMet) cuya función es iniciar la síntesis de proteína, también produce S-adenosimetionina, donador de grupos metilo los cuales participan en reacciones para la biosíntesis de lípidos y otros compuestos que están envueltos en el transporte de lípidos hacia el torrente sanguíneo (Patterson y Kung 1988, D' Mello 2003).

De acuerdo con NRC (2001), los requerimientos de aminoácidos para ganado lechero no son conocidos con certeza. Desde el año 1981 se han

realizado aproximaciones de los requerimientos utilizando un modelo factorial, a partir de los requerimientos netos de proteína para mantenimiento, crecimiento, preñez y lactancia, utilizando la composición en los productos alimenticios y la eficiencia en el uso de AA absorbidos para mantenimiento y formación de producto. La lisina debe contribuir alrededor de 7,0% y metionina 2,5% del total de AA para un máximo contenido y rendimiento de proteína en leche.

Los aminoácidos distintos a la leucina sirven como precursores para la gluconeogénesis y cetogénesis, todos pueden convertirse a ácidos grasos o servir como fuente inmediata de energía metabólica cuando se oxida a CO₂ (NRC 2001). En la degradación de aminoácidos, el esqueleto de carbono sigue distintas vías, estos aminoácidos que son desdoblados a piruvato o intermedios clave para el ciclo del ácido tricarboxílico tiene el potencial de producir glucosa vía fosfoenilpiruvato, estos aminoácidos son llamados glucogénicos, los AA que producen acetil CoA se clasifican como cetogénicos, algunos AA pueden ser clasificados en ambas categorías. La metionina se clasifica como glucogénico, mientras que la lisina se clasifica como cetogénico (D' Mello 2003).

Deficiencia de metionina

La metionina y lisina son considerados los aminoácidos esenciales para la síntesis de leche y la síntesis de proteína láctea en vacas altas productoras (Pattersonl y Kung 1988, Piepenbrink et al. 1996, Xu et al. 1998, Chen et al. 2011), debido a que el porcentaje de Lis y Met excretado por la glándula mamaria es mayor que los otros aminoácidos, por lo que se enfatiza en la importancia de estos dos aminoácidos para la producción láctea (Bremmer et al. 1997). También Patterson y Kung. (1988), señalan que la Met es rápidamente degradada en el rumen por los microorganismos. Aparte de que NRC (2001) y Chen et al. (2011) mencionan que la lisina se identificó como el primer aminoácido limitante para terneros recién destetados, ganado en desarrollo y vacas lactantes cuando los alimentos a base de maíz y derivados de éste proveen la mayoría de proteína de sobrepaso. En contraste la metionina se considera limitante en estas etapas

cuando la dieta se compone de pequeñas cantidades de maíz, altas cantidades de forrajes o cuando las fuentes de proteína de sobrepaso se componen de productos derivados de la soya o proteínas de origen animal. En el Cuadro 1 se describe la composición de la lisina y metionina de las materias primas comúnmente utilizadas en la alimentación de rumiantes.

Cuadro 1. Aporte de lisina y metionina de algunas materias primas utilizadas en la nutrición de ganado lechero.

	Lisina	Metionina
	g/100 g MS	
Kikuyo 32 días	0,47	0,77
Rye Grass 42 días	0,75	0,25
Maíz	0,24	0,17
Cebada	0,38	0,17
Granos de destilería (DDGS)	0,62	0,43
Harina soya 48%	2,78	0,64

Fuente: (Sauvant et al. 2004; Zuñiga 2013¹)

L-Met es un aminoácido nutricionalmente indispensable que puede ser usado para la síntesis de proteína, e incorporado al ciclo de Met (Martin-Venegas et al. 2013). De ahí la importancia de identificar la composición de aminoácidos en los alimentos utilizados en ganado lechero y suplir las deficiencias haciendo uso de AA sintéticos.

Aminoácidos sintéticos

Los AA están presentes en proteínas de plantas y animales y aquellos producidos por la industria por tecnologías fermentativas como la lisina, treonina, y triptófano, quienes se encuentran en la L-forma. En contraste la metionina producida mediante síntesis química es del tipo DL-mezcla racémica (NRC 2001).

La necesidad de impactar a nivel intestinal y evitar la degradación microbial, por especies de bacterias como *Bacteroides*, *Butyrivibrio*, y

¹ Zuñiga, A. 2013. Comunicación Personal. Asesor técnico, gerencia de alimentos balanceados, Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L. Alajuela, Costa Rica.

Selenomonas quienes se consideran que poseen la mayor capacidad proteolítica (Chalupa 1975), ha creado la necesidad de utilizar tecnologías que protejan los aminoácidos desde hace más de 30 años. Sin embargo esto ha enfrentado dificultades en tratar de obtener tecnologías rentables principalmente por la falta de resistencia de los productos encapsulados y la reactividad de algunos aminoácidos con el recubrimiento de polímero que es inestable, el cual rompe las partículas en el rumen durante la masticación, sumado a las inconsistencias en degradación post ruminal del polímero (Robinson 2010).

No obstante en los últimos años se han desarrollado tecnologías que permiten la disminución en la degradación ruminal mediante mecanismos físicos y químicos, logrando un balance entre el nivel mínimo de degradación ruminal con el máximo nivel de digestibilidad.

La forma más antigua de proteger proteínas y aminoácidos es el tratamiento por calor. Este proceso consiste en aplicar un moderado nivel de calor promoviendo la reacción de Maillard, donde los azúcares presentes crean un enlace, el cual no es susceptible a la ruptura por parte de los microorganismos del rumen. Actualmente se ofrecen otras alternativas de protección, como la protección con taninos, protección con polímeros, la quelación, o encapsulación con grasas, así como el uso de aminoácidos análogos (Chalupa 1975, Metcalf 2001).

La protección con polímeros son pH-sensitivos y son diseñados para mantener su integridad estructural en el pH normal encontrado en el rumen, el bajo pH del abomaso dispara el desdoblamiento de la protección, permitiendo la liberación del aminoácido para la absorción, los compuestos que recubren la metionina están compuestos de ingredientes hidrofóbicos como etil celulosa (Papas et al. 1984, Ardaillon y Christian 1994, Rathbone y Gurny 2000).

Las formas encapsuladas como las embebidas en matrices proteicas de grasa o tratadas con formaldehído son parcialmente estables en el rumen y su liberación post ruminal es pobre (Papas et al. 1984).

Todos los aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas pueden estar en la configuración L, sin embargo los animales son capaces de utilizar algunos enantiómeros D, en efecto la generalizada comercialización de suplementos para dietas con metionina se ha logrado con la mezcla racémica (D' Mello 2003), como por ejemplo el D L isómero ácido 2-hidroxi 1-4-metiltio butanóico (HMTBA) (Cuadro 2).

El HMTBA es producido mediante un proceso simple, ya que no es necesario insertar un grupo amino en la molécula. Este proceso también se realiza vía β -methyltiopropionaldehido, cuya cantidad reacciona con ácido hidrocianico a 40°C, se produce cianohidrin que puede ser hidrolizado con ácido sulfúrico a 140-160°C y 3-4 bar a DL-hidroxianálogo metionina (Wittcoff et al. 2013).

Cuadro 2. Estructura de DL-metionina e hidroxianálogo de metionina.

Compuesto	Estructura
DL-Metionina	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$
Hidroxianálogo de Metionina	$\begin{array}{c} \text{OH} \\ \\ \text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-COOH} \end{array}$

Fuente: (Patterson y Kung 1988)

Degradación, absorción y metabolismo de aminoácidos sintéticos

La acción de adicionar aminoácidos sintéticos al rumiante no garantiza su total absorción a nivel intestinal, ya que una porción de ésta será degradada a nivel ruminal.

Para el HMTBA (84% Met), una vez adicionada e ingerida el 60% será utilizada en el rumen donde estimulará la síntesis de proteína microbial, el 40% remanente abandona el rumen con la fase líquida de la ingesta y es absorbida por

difusión a lo largo del tracto digestivo (Klangnok et al. 2011). En general los Hidroxianálogos de metionina y derivados de hidroxianálogos de metionina se degradan más lentamente que la metionina (Patterson y Kung 1988).

Koenig et al. (2002) al medir el escape ruminal de varias cantidades de HMTBA en forma líquida, encontró que el 39,5% escapó de la degradación ruminal, el porcentaje no fue afectado por la cantidad de AA ingerido. Mientras que Koenig y Rode (2001) al evaluar la biodisponibilidad de Met protegida en el rumen (MPR) con poliéster encontraron que la biodisponibilidad de metionina fue de 22-34%. Para Lapierre et al. (2011) del 43-74% de la dosis infundida de HMTBA vía vena yugular, contribuye a incrementar la disponibilidad de Met en el cuerpo, sin embargo a nivel visceral, hígado, y glándula mamaria extraen el 11, 37, y 3,4% de la cantidad.

El HMTBA es una fuente sintetizadora de metionina, después de la absorción, la utilización biológica de HMTBA se basa en su conversión a L-Met, un proceso que inicia en el intestino (Martin-Venegas et al. 2013).

Esta conversión de las fuentes sintética hacia el aminoácido involucra dos pasos enzimáticos: oxidación estereoespecífica de α -carbon a 2-ceto-(4-metiltio) ácido butanoico (KMB) seguido por la transmaminación a L-Met (Martin-Venegas et al. 2013). Cuando el aminoácido es absorbido hacia la vena porta, el hígado es el primer órgano que reconoce el AA y es el sitio catabólico de algunos AA esenciales, como Met, His, Fen, y Tir. En lactancia temprana de vacas, lecheras la remoción hepática de Met es significativa, variando entre 30 y 40% de la absorción portal neta (Berthiaume et al. 2006).

Van Amburgh et al. (2010) mencionan que existen diferentes valores de utilización de proteína metabolizable, concluyendo que el óptimo de eficiencia de PM a proteína neta (NP) debe estar entre 0,62 y 0,64 para vacas lecheras, debido a que cada aminoácido posee su propia eficiencia para mantenimiento, crecimiento y lactancia.

Sin embargo para lograr un mejor entendimiento de la relación entre suplir AA y salidas en proteína láctea, se necesita más información en metabolismo post absorbible de aminoácidos, incluyendo la metionina y su impacto en la eficiencia de convertir AA absorbidos en proteína láctea (Berthiaume et al. 2006).

Una vez absorbidos los aminoácidos a través del intestino están inmediatamente disponibles para todas las células del cuerpo, para la síntesis de proteínas. Los aminoácidos en el torrente sanguíneo son los precursores directos para la síntesis de la caseína, principal proteína láctea, en las células secretoras de la glándula mamaria (Frandsen et al. 2003).

Respuesta en producción ante el uso de metionina sintética

Desde el año 1984 se han realizado investigaciones en donde se mide la respuesta en producción y composición láctea ante el suministro de aminoácidos inertes al rumen (AAPR) en la forma de metionina (MPR) o lisina (LPR), hidroxianálogo de metionina (HMTBA), o aminoácidos libres, ya sean adicionados a la ración, o ajustando la relación Lis:Met de la dieta. Los resultados en respuesta en producción y composición láctea en respuesta a Met y Lis han sido inconsistentes.

Papas et al. (1984) al evaluar con cinco concentraciones de Met encapsulada inerte al rumen (MPR), (0, 157, 315, 472 y 630 mg/kg MS), encontraron que las concentraciones de metionina en plasma sanguíneo seguían una tendencia lineal. Las vacas que se suplementaron con metionina consumieron más alimento y por ende obtuvieron mayores ganancias de peso que el control. Por su parte Berthiaume et al. (2006) al evaluar el mismo aditivo (MPR), en el utilizando dosis de 0, 36 y 72 g/d, no encontraron efectos en rendimiento lácteo, sin embargo sí encontraron un incremento lineal en el contenido de proteína verdadera en leche debido a un aumento de en la concentración arterial de metionina.

En otro trabajo se evaluó Met acompañado de Lis inerte al rumen (AAPR) en dos niveles de PC (14% y 18%). Los AA fueron adicionados al nivel bajo de PC para proveer el 0, 50, 100 y 150% de la eficiencia predicha de Lis y Met. Los resultados mostraron que los mayores rendimientos en producción y composición láctea fueron los correspondientes al tratamiento con elevado porcentaje de proteína cruda. Al suplir AA a bajo nivel de PC no afectó la ingesta de MS, los rendimientos lácteos ni composición, a excepción del rendimiento en grasa láctea el cual obtuvo un efecto mayor con 0 y 150% de la eficiencia de Met y Lis (Piepenbrink et al. 1996).

En otras investigaciones en donde se evaluó la adición Lis y Met para determinar la respuesta en producción y composición láctea en dietas a base de silo de maíz, y suplementadas con una mezcla de tres suplementos (harina de soya, semilla de algodón y harina de gluten de maíz, encontraron que en lactancia temprana y tardía la adición de AA eleva la concentración proteica en leche en 1 g/kg de leche (Armentano et al. 1993).

Al medir las respuestas en composición láctea ante el suministro de somatotropina bovina recombinante (rbST), y Met y Lis protegida al rumen (AAPR) (12 g de mezcla que incluía 50% Lis más 15% de Met), encontraron que el rendimiento lácteo incrementó por rbST pero no fue alterado por RPAA comparado con el control. Los AAPR incrementaron los porcentajes en grasa, proteína y sólidos totales en leche; sin embargo los rendimientos en componentes lácteos no fueron afectados por estos AA. En una dieta compuesta de heno de alfalfa, silo de maíz, maíz molido, harina de soya y grasa, con un 17,6% de PC (Bremmer et al. 1997).

Otras formas de metionina como los hidroxianálogos también han sido estudiadas. Rulquin et al. (2006) al medir diferentes formas de metionina en el desempeño de vacas lactantes, utilizando dosis de 10g de metionina absorbible (D,L-2-Hidroxi-4-(metiltio)-ácido butanóico (HMTBA) y ésteres de isopropil de HMB (HMBi)), comparados con metionina protegida (MPR). Encontraron que las concentraciones de Met en plasma fueron mayores con el uso de HMBi y RPM,

así como mayores rendimientos en proteína láctea. Los niveles de HMTBA no mejoraron la disponibilidad de metionina para la síntesis de proteína láctea.

Al cuantificar la respuesta a producción láctea al suplir diferentes fuentes de metionina absorbible como isopropil-2-hidroxi-4-(Metiltio)-ácido butanóico (HMBi), o metionina protegida al rumen (MPR) ajustando la concentración de Lis y Met en la PM en 3,0:1. Se encontró que adicionar con HMBi incrementó el rendimiento lácteo, contenido proteico y sólidos no grasos en todas las dietas que contenían metionina suplementada (Chen et al. 2011).

En nuestro país solo se han registrado dos investigaciones acerca del uso de aminoácidos de sobrepaso en ganado lechero, el primero en realizarse fue en el año 1990, en donde Dormond et al. (1990) midieron el efecto de DL-metionina en vacas de doble propósito en pastoreo, éstas se suplementaron con niveles de 0, 15 y 30 g/d, éstos autores encontraron que al alimentar con 30 g, incrementa la producción láctea en 2,5 kg, pero no detectaron diferencia en leche residual ni producción de grasa, el contenido graso en leche residual tuvo efectos significativos al utilizar 15 g de metionina.

Por su parte Arroyo (1992), al utilizar niveles crecientes de MHTBA (0, 10, 20 y 30 g/día), no encontraron diferencias significativas en la producción láctea, estos autores notaron una disminución en la producción láctea conforme aumentaba el nivel de metionina, asociado a una disminución en el consumo, misma tendencia encontrada en la producción de sólidos totales.

Eficiencia de nitrógeno ante el uso de AA sintéticos

El nitrógeno ureico en leche (NUL), es un subproducto del metabolismo de proteínas en ganado lechero, Guo et al. (2004) sugieren que un valor de NUL elevado puede estar relacionado con condiciones que afectan la reproducción de vacas en el hato, hecho que podría impactar negativamente la rentabilidad económica de las lecherías.

Los productores lecheros e investigadores poseen como meta la conversión eficiente de nutrientes dietéticos en leche, debido a que la respuesta de proteína láctea ante la proteína dietética es pobre, debido a la baja eficiencia (25 a 30%) en convertir N dietético en leche (Bequette et al. 1998).

Es por ello que en la actualidad se realizan investigaciones en las que se permita reducir la cantidad de PC sin poner en peligro los rendimientos lácteos, una de las tecnologías utilizadas es la utilización de Lis y Met inerte al rumen (Dinn et al. 1998).

Como es conocido, la excreción de N en orina y heces puede ser reducida cuando en el alimento se presentan bajas concentraciones de proteína cruda y al suplementar con aminoácidos protegidos del rumen (Dinn et al. 1998).

Chen et al. (2011), encontraron que suplementar con 0,06% de MPR y un nivel de 15,5% de PC incrementó la eficiencia de nitrógeno. En ese mismo estudio observaron que alimentar con 16,8% de PC sin fuentes de metionina eleva el NUL, excreción urinaria de nitrógeno y reduce la aparente eficiencia de nitrógeno de 34,5% a 30,2%, en relación a aquellas dietas con un nivel de 15,5% de PC más aminoácidos de sobrepaso, sin obtener diferencias en el nivel de producción.

En otra investigación llevada a cabo por Leonardi et al (2003) al evaluar dos niveles de proteína (16,1 vs 18,8%) con y sin suplementación de RPM. Cuantificaron que el incremento de proteína cruda aumentó el NUL en 3,9 mg/dl, sin incrementar los rendimiento lácteos, en este estudio la suplementación con metionina no tuvo un efecto en excreción de N en orina ni heces.

Por su parte Dinn et al. (1998), al probar aminoácidos inertes al rumen para reducir la excreción de nitrógeno en dietas altas en proteína (18,3%) y dietas bajas en proteína (16,7 y 15,3%) más AAPR. Cuantificaron que la eficiencia de N, y N lácteo como porcentaje de N ingerido, fue mejor en dietas bajas en PC, los valores de nitrógeno ureico en sangre fueron 15,9, 12,9, y 10,0 mg/dl para las dietas altas, mediana y baja en PC.

Los resultados encontrados indican que es posible hacer un uso más eficiente de la PC al utilizar AA inertes al rumen. Sin embargo puede resultar en la obtención de menores rendimientos en producción ante una mejoría en la utilización de N.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo fue realizado del 21 de abril al 5 de junio del 2014, en la localidad de Palmira, Alfaro Ruiz (10°12'21.44"N, 84°22'56.67"O). En la investigación se evaluó el desempeño productivo y composición láctea, así como la utilización de N (nitrógeno ureico en leche NUL) en vacas lactantes en pastoreo ante el suministro del hidroxianálogo de metionina 2-Hidroxi-4-Metiltio Butanóico Ácido (HMTBA) y dos niveles de proteína cruda dietética.

Composición de las dietas

Los tratamientos se asignaron en un arreglo factorial 2 x 2, con dos niveles de proteína cruda en ración total (16,6% vs. 15,8% (nivel estándar)), con o sin suplementación de HMTBA (25 g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA). Los cuatro tratamientos fueron: 1) alto nivel de proteína más HMTBA (APC+HMTBA), 2) alto nivel de proteína (APC) 3) bajo nivel de proteína más HMTBA (BPC+HMTBA), y 4) bajo nivel de proteína (BPC). Las dietas fueron balanceadas para vacas que producían 33,30 kg de leche al día (3,28% de grasa y 2,92% de PC), y consumían 18,80 kg de MS al día. Las dietas APC se obtuvieron adicionando harina de soya en la cantidad que se permitiera observar una diferencia de 1% PC en ración total respecto a las dietas BPC.

Las vacas pastorearon pasto kikuyo (*Kikuyochloa clandestinum*). Los ingredientes y la composición química de la dieta se muestran en el Cuadro 3. La dieta contenía 39,3% de forraje y 60,6% de concentrado. El pasto de corta fue cosechado mecánicamente a los 90 días y ofrecido el mismo día, el forraje de piso tuvo un período de descanso de 32 días, recibía fertilización nitrogenada con 252 kg N/ha/año. El componente forrajero se complementaba con heno de pasto

transvala (*Digitaria decumbens* Stent., cv. *Transvala*) y suazi (*Digitaria swazilandensis*). El resto de las fuentes de alimento se componían de alimento balanceado, pulpa de cítricos deshidratada, harina de soya, grasa de sobrepaso y suplementación mineral y vitamínica.

Cuadro 3. Composición química de las materias primas utilizadas.

	Kikuyo 90 días	Kikuyo 32 días	Heno	Alimento balanceado	Pulpa Cítrico	Harina de Soya	Grasa de sobrepaso
Ítem	g/100 g MS						
MS	18,84	18,75	86,74	87,00	87,00	89,50	88,00
PC	15,22	25,82	4,10	16,00	4,00	48,80	
Cenizas	13,19	10,78	12,91				
FDN	63,2	58,15	73,83	12,00	14,00	9,80	
FDA	38,26	33,10	61,87			6,20	
Grasa sobrepaso							80,88
	% PC						
Met	0,51	2,88	2,39	2,06	1,10	1,60	
Lis	0,37	1,76	2,12	2,44	0,95	2,85	

Unidad Experimental

La unidad experimental fue cada una de las vacas. Se utilizaron 20 vacas multíparas de la raza Holstein durante 35 días experimentales y 15 días de período de acostumbramiento. Durante el estudio las vacas promediaron 138 ± 11 días de lactancia, $33,30 \pm 3,60$ kg de leche y $656,80 \pm 46,00$ kg de peso vivo (PV).

Muestreo y análisis

Las vacas se ordeñaron dos veces al día. La producción láctea de ambos ordeños (1:00 am y 2:00 pm) se registró una vez por semana, se tomaron dos muestras homogéneas de ambos ordeños una vez por semana para cada animal, y se analizaron independientes para la composición láctea. En el caso del análisis NUL se analizó una sola muestra semanal de un ordeño por vaca. Las muestras se tomaron por medio del recolector de muestra homogéneo de Waikato, mismo que se utilizó para averiguar la producción láctea. Las muestras lácteas se

analizaron en el laboratorio de recibo de leche de la Cooperativa Dos Pinos, los análisis realizados determinaron la proteína láctea, grasa láctea y lactosa.

El contenido de minerales y NUL se analizó en el laboratorio de alimentos balanceados de la misma cooperativa. A los animales se les estimó el peso corporal tres veces durante el estudio, para esto se utilizó la medición de la circunferencia torácica, la cual se relaciona con el peso mediante la metodología descrita por Mahecha et al. (2002). La cantidad de alimento ofertado y rechazado se midió una vez por semana, el consumo de forraje de pastoreo se determinó semanalmente mediante la metodología del Botanal® (Hargraves y Kerr 1978). Se tomaron dos muestras de forraje al inicio y mediados del período de prueba para analizar el contenido de materia seca (MS) y proteína cruda (PC). Se tomaron muestras de los alimentos que aportaban proteína cruda para analizar el perfil de aminoácidos al inicio del ensayo.

Para los análisis químicos de los forrajes, las muestras fueron secadas a 60°C y se determinó la MS (AOAC 1990). El contenido de PC se determinó por el método micro-Kjeldahl (AOAC 1990). La fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinó utilizando la metodología descrita por Van Soest et al. (1991) y cenizas mediante el método descrito por AOAC (1990). Para el análisis de perfil de aminoácidos realizados a las muestras de forrajes, alimento balanceado y harina de soya, se utilizó la técnica cuantitativa cromatográfica HPLC (Bartolomeo y Maisano 2006).

Los análisis de composición láctea y sólidos totales en leche fueron determinados utilizando el equipo Milko Scan FT-120. Para el análisis de NUL se utilizó el método enzimático y la cuantificación por espectrofotometría usando el ChemSpec® 150.

Descripción del modelo estadístico

Se realizó un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial 2 x 2. Las vacas se asignaron para cada bloque de acuerdo a número de parto y días

en lactancia. Se realizaron cinco bloques con cuatro unidades experimentales cada uno. El modelo estadístico utilizado fue:

$$Y_{ijk} = \mu + B_k + A_i + B_j + (A \times B)_{i,j} + e_{ijk}$$

Donde:

μ = media general

B_k = efecto del bloque

A_i = efecto de la concentración de PC.

B_j = efecto de la adición de HMTBA.

$(A \times B)_{i,j}$ = efecto interacción

e_{ijk} = error experimental

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento MIXED de SAS (SAS/STAT, SAS Institute Inc., Cary, NC; 2004), donde se tomó como covariable el nivel de producción de la vaca de la lactancia anterior. El efecto del tratamiento se consideró significativo cuando $p \leq 0,05$, y se realizó la comparación entre medias por medio de la prueba Waller-Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Composición de la dieta

La composición química de los tratamientos se presenta en el Cuadro 4. Para lograr los tratamientos con APC, se adicionó harina de soya en la cantidad que no sobrepasara el nivel recomendado de PC en la ración total y que permitiera observar una diferencia del 1% PC en ración total con respecto a los tratamientos de BPC. La diferencia entre ambos niveles de proteína cruda fue de 0,8% (Cuadro 4). Los tratamientos de APC se formularon de manera que se cumplieran los niveles de PDR para no limitar la producción de proteína microbial.

De acuerdo con NRC (2001) las concentraciones recomendados para PDR y PNDR deben de ser 62-66% y 34-38% como porcentaje de la PC, el Cuadro 4 muestra que los niveles de PDR son superiores y los de PNDR son inferiores al recomendado, lo que se debe a un mayor porcentaje de degradabilidad ruminal de la harina de soya (67,7% PDR vs. 32,3% PNDR) (Mjoun et al. 2010). Teniendo en cuenta que el alimento balanceado aporta harina de soya como fuente de PC, también se limita la cantidad de PNDR en los tratamientos.

Otro aspecto a considerar es el elevado contenido de PC del forraje kikuyo de piso (Cuadro 3), 3,22% más alto que el valor de proteína cruda para este forraje en zonas altas. Además de acuerdo con Sánchez (2002) del total de la PC que ingresa al rumen el 22% es no aprovechable, un 36,6 es soluble y un 42,3 insoluble pero aprovechable, es decir que se aprovechará en el rumen y a nivel intestinal, la mayor cantidad de esta proteína se aprovechará a nivel ruminal. De esta manera la combinación de estos dos factores provoca que el aporte de PC en las dietas sean altamente degradables.

De acuerdo con el balance nutricional realizado con el programa NRC (2001), la cantidad de metionina disponible para absorción a nivel intestinal incrementó en los tratamientos experimentales al adicionar HMTBA respecto al control. La concentración de metionina como porcentaje de PM aumentó de 2,10% a 2,55% en las dietas APC al adicionar HMTBA y de de 2,19% a 2,70% en

los tratamientos BPC (Cuadro 5). El NRC (2001) no reporta algún requerimiento para aminoácidos expresado en gramos por día, pero recomienda que la lisina y metionina debe aportar el 7,2% y 2,4% de la proteína metabolizable (PM) respectivamente.

Cuadro 4. Composición química de las dietas.

Ítem	Dietas ¹			
	APC+HMTBA	APC	BPC+HMTBA	BPC
Ingrediente (% de MS)	g/100 g MS			
Kikuyo	24,79	24,34	28,61	27,38
Kikuyo corta	2,37	2,78	3,69	3,13
Heno	9,39	9,19	11,37	10,38
Alimento balanceado	47,71	48,71	43,17	45,40
Harina de soya	2,86	2,81	0,36	0,26
Pulpa de cítricos deshidratada	9,83	9,64	10,79	10,80
Grasa de sobrepaso	1,81	1,77	1,98	2,00
Premezcla vitaminas y minerales	0,78	0,76	0,85	0,65
HMTBA producto (84% Met)	0,13	0,00	0,13	0,00
Consumo MS, Kg/día	19,48	20,13	17,97	17,60
Composición química	g/100 g MS			
MS, g/100 g (Tal como ofrecido)	43,59	41,96	40,51	41,53
ENL (Mcal/kg de MS)	1,65	1,64	1,62	1,64
PC	16,60	16,60	15,80	15,80
PDR (% de PC)	70,24	68,72	71,68	71,10
PNDR (% de PC)	29,88	31,28	28,57	28,90
Ca + P	1,66	1,66	1,72	1,62
FDN	35,46	34,84	38,08	37,06
FDA	22,28	22,04	24,40	23,60
CNF	32,96	33,24	30,88	31,90
Relación CNF:Pded	2,84	2,94	2,80	2,90

¹En los diferentes tratamientos, APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).

Por lo que la adición de HMTBA condujo a un incremento en la concentración de metionina disponible, sin embargo se disminuyó la relación Lis:Met que según el NRC (2001) debe de ser 3,0. Lo anterior se puede atribuir al bajo aporte de Lis en las fuentes de alimento (Cuadro 3) y al bajo aporte de PNDR de las dietas (Cuadro 4).

Este incremento en el estatus de Met en la dieta ha sido documentado por Chen et al. (2011) y Wang et al. (2010), quienes encontraron un aumento en el aporte de Met metabolizable al utilizar HMBi (ácido 2-hidroxi-4-metilmercapto butírico). Por lo que la utilización de análogos de metionina se considera una opción válida para incrementar los niveles de Met en dietas con niveles deficientes en este aminoácido.

Cuadro 5. Aporte de HMTBA en el mejoramiento de AA metabolizable.

Ítem	Dietas			
	APC+HMTBA	APC	BPC+HMTBA	BPC
Met protegida HMBTA (g/día)	8,40	0	8,40	0
Met absorbida (g/día)	42,60	43,40	37,80	38,00
Total met absorbida (g/día) ¹	51,00	43,40	46,20	38,00
Lis metabolizable (% PM)	5,82	5,77	5,84	5,84
Met metabolizable (% PM)	2,55	2,10	2,70	2,19
Relación Lis:Met	2,28	2,74	2,17	2,67

¹ Se consideró HMTBA 84% de DL-metionina, el 60% degradable a nivel ruminal y 40% absorbida a nivel post ruminal (Klangnok et al. 2011).

El consumo de MS fue superior para los tratamientos APC en relación a los tratamientos BPC, sin embargo no fueron significativamente diferentes ($P>0,05$) entre ellos (Cuadro 4). El elevado consumo en los tratamientos APC se debe a que en ellos quedaron agrupadas las vacas con elevado nivel de producción respecto a los tratamientos BPC por distribución aleatoria.

Otros trabajos tampoco han encontrado diferencias en el consumo de MS ante el suministro de HMTBA, como los descritos por Klangnok et al. (2011), Chen et al. (2011) y Lapierre et al. (2011). Por lo que la adición de este aditivo no parece afectar el consumo de MS, sin embargo Polan et al. (1991) encontraron una depresión en el consumo de MS al suministrar grandes cantidades de MPR en temprana lactancia asociadas a factores organolépticos.

Respuesta en producción láctea

En el presente estudio no fue posible encontrar efectos significativos al suplementar HMTBA en producción de leche, leche corregida al 4% de grasa,

grasa láctea, proteína láctea, lactosa y sólidos totales ($P>0,05$). Los componentes lácteos tampoco fueron afectados ($P>0,05$) por la adición de HMTBA en los diferentes tratamientos, como se aprecia en el Cuadro 6 y Figuras 2. El incremento en producción en los tratamientos APC se debió al elevado consumo de MS en las vacas que correspondieron a esos tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de la dieta en producción de leche y componentes lácteos.

Ítem	Dietas ¹				Desviación estándar
	APC+HMTBA	APC	BPC+HMTBA	BPC	
Rendimiento leche, kg/d	35,01	37,60	29,60	31,01	1,33
Leche corregida 4% de grasa, kg/d	30,40	32,93	27,43	26,15	1,36
Grasa Láctea					
kg/d	1,10	1,21	1,05	1,00	0,08
Porcentaje	3,14	3,21	3,56	3,21	0,26
Proteína láctea					
kg/d	1,01	1,12	0,88	0,89	0,04
Porcentaje	2,88	2,98	2,96	2,87	0,04
Lactosa					
kg/d	1,88	2,06	1,57	1,70	0,06
Porcentaje	4,67	4,76	4,63	4,74	0,04
Sólidos totales					
kg/d	3,99	4,38	3,50	3,59	0,21
Porcentaje	11,40	11,66	11,84	11,57	0,25
Peso vivo, Kg	724	642	639	621	46,05
NUL (mg/dL)	21,10	20,30	17,95	18,71	1,09

¹ En los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).

La literatura no ha sido consistente en respuestas positivas en producción láctea ante el uso de HMTBA u otro tipo de Met protegida. De acuerdo con Zanton et al. (2014) al realizar un meta análisis, concluyen que no existen respuestas significativas entre rendimiento lácteo y la suplementación de Met, sin embargo, existe una tendencia de incremento cuando las vacas fueron suplementadas con HMTBA. Esa tendencia no se pudo confirmar en el presente estudio, ya que adicionar HMTBA en ambos niveles de PC no incrementa la producción láctea, sin embargo la cantidad de leche corregida al 4% de grasa fue mayor en el tratamiento experimental para los grupos de BPC (Figura 2).

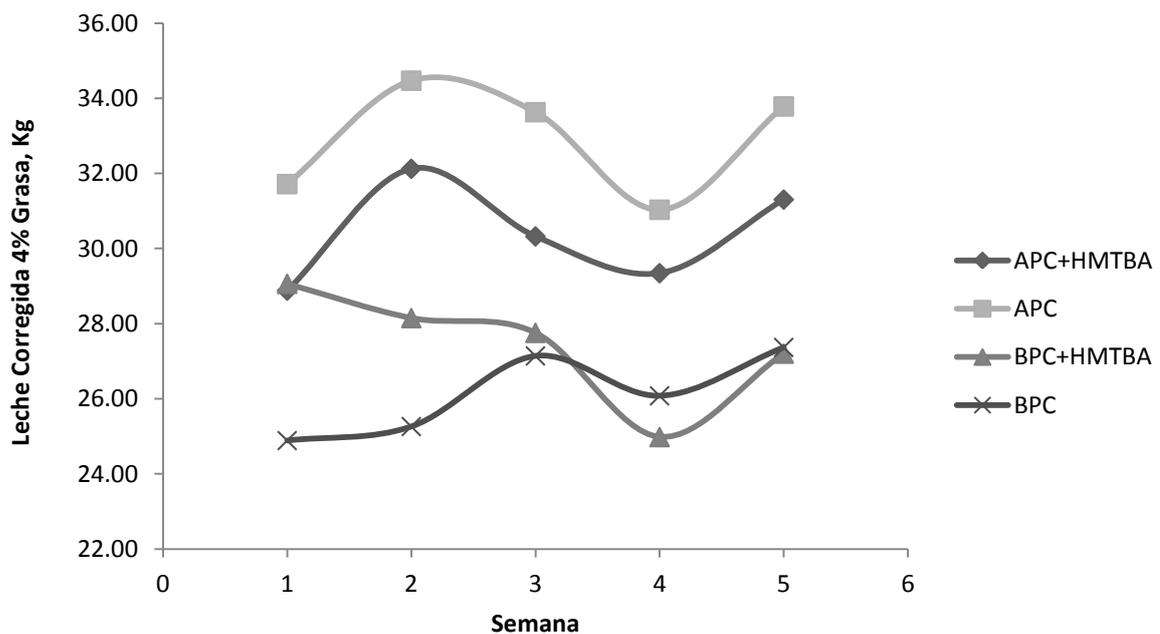


Figura 2. Efecto de suplementación HMTBA sobre la producción de leche corregida a 4% grasa basado en la fórmula (0,4 x Kg de leche + 15 x Kg grasa), en los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).

En un estudio desarrollado por Leonardi et al. (2003), al adicional MPR en dos niveles de PC (16,1 y 18,8%), concluyen que no se cumple la hipótesis de que al suplementar este aminoácido en dietas deficientes de Met incrementa la producción láctea. Por su parte Phipps et al. (2008) al utilizar HMBi en dos niveles de PC, estándar 16,9% y deficiente 14,7% no encontraron respuesta positiva en producción láctea en ambos niveles de proteína cruda, asociándolo a un faltante de PNDR u otro aminoácido como Lis. Esto podría asociarse a la presente investigación en la cual no se observaron respuestas positivas.

Phipps et al. (2008) concordaron que el empleo de un cuadrado latino de 4 semanas como diseño experimental puede afectar la respuesta, ya que St-Pierre y Sylvester (2005) encontraron un incremento en rendimiento lácteo atribuible a una respuesta progresiva la cual alcanzó significancia a partir de la semana 11 de 17 experimentales, motivo por el cual el período experimental de 5 semanas

utilizado en el presente estudio pudo ser insuficiente para observar una respuesta positiva.

Otros trabajos enfocados en medir producción de leche al utilizar HMTBA en tratamientos isoprotéicos (Johnson-VanWieringen et al. 2007) observaron un incremento en leche corregida al 3,5% de grasa al suplementar Lis.HCl y HMTBA a partir de la semana 14 y 17 post parto, indicando que la combinación de suplementar ambos aminoácidos y somatotropina bovina recombinante (rbST) resultan en un mayor uso de AA para la producción láctea. Este resultado no solo confirma el efecto progresivo de HMTBA en el tiempo, sino que también hace énfasis en el hecho de que la disponibilidad de Lis puede ser limitante para la producción de leche. Ya que VanWieringen et al. (2007) utilizaron un porcentaje de Lis de 6,60%, otros autores también reportan niveles más elevados de Lis como St-Pierre y Sylvester (2005) y Chen et al. (2011) quienes utilizaron 6,80% y 6,59% de Lis como porcentaje de PM respectivamente. El contenido de Lis de la presente investigación fue de 5,80%, por lo que se puede concluir que la disponibilidad de Lis dietética pudo ser un factor limitante en la producción de leche.

Producción y composición de grasa láctea

En cuanto a la producción y composición de grasa láctea no se encontraron efectos significativos ($P > 0,05$), sin embargo se encontró una tendencia positiva ($P < 0,10$) en el contenido de grasa láctea en los tratamientos BPC y negativa ($P > 0,10$) en los tratamientos APC (Cuadro 6 y Figura 3). Esta variable ha sido la respuesta positiva más constante reportada en la literatura ante la suplementación de HMBTA.

El resultado se confirma con diversas investigaciones realizadas, como en el caso de Chen et al. (2011) quienes encontraron efectos positivos en contenido de grasa láctea al suplementar HMBi en la primer semana de suplementación, resultado que concuerda con el encontrado por Johnson-VanWieringen et al. (2007) quienes encontraron un incremento en contenido de grasa láctea en las primeras 4 semanas de lactancia. Otros trabajos encontraron un incremento en

rendimiento de grasa láctea atribuido al incremento en producción de leche como en el caso de Phipps et al. (2008). Por otra parte St-Pierre et al. (2005), Rulquin et al. (2006) y Klangnok et al. (2011) no encontraron diferencias significativas en contenido y rendimiento de grasa láctea debido al corto período de experimentación (35 días), o al bajo potencial genético de los animales (12,5 kg de leche).

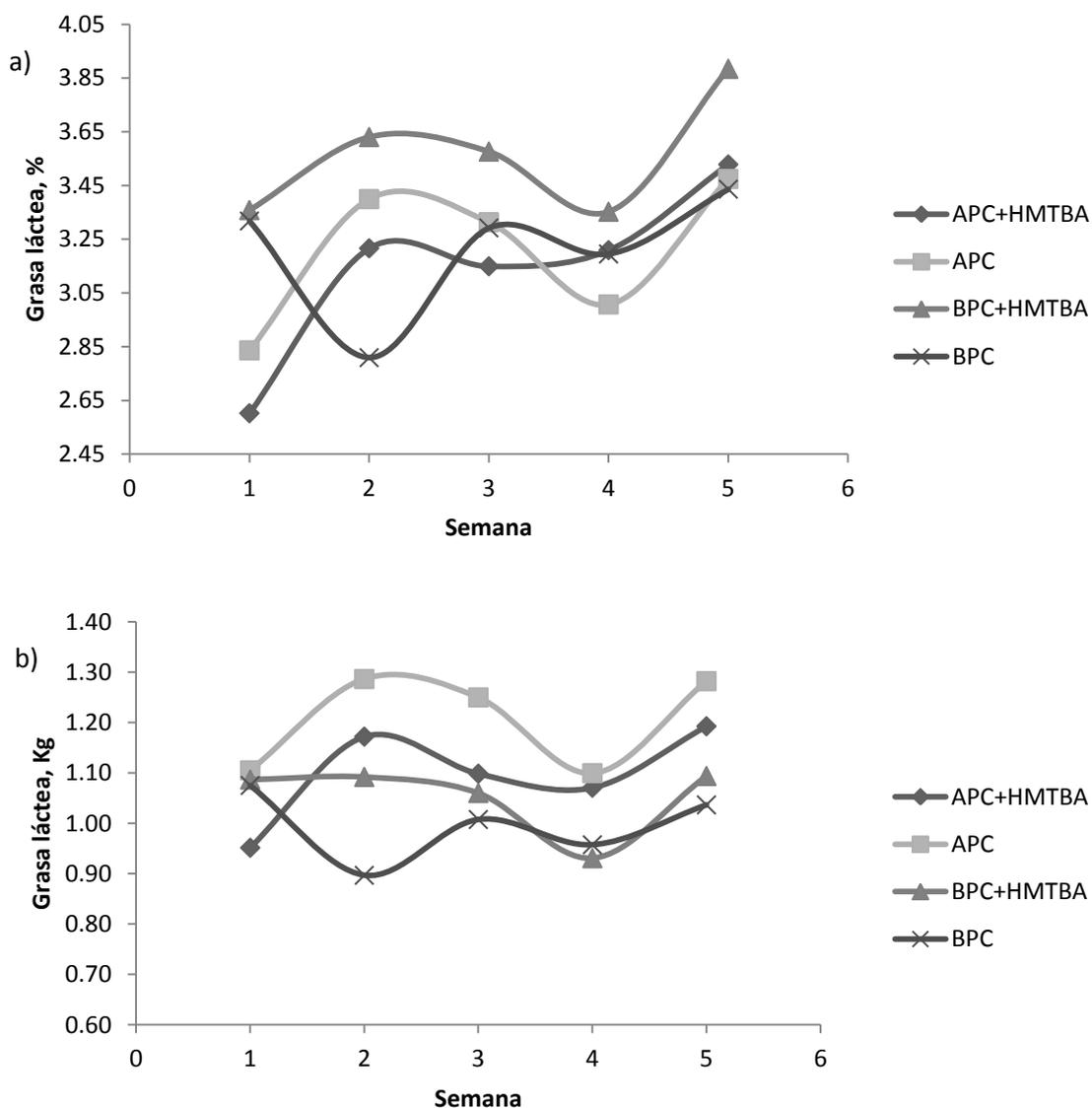


Figura 3. Efecto de suplementación HMTBA sobre el contenido de grasa láctea a) y rendimiento de grasa láctea b), en los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFP™, NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFP™, NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).

En el meta análisis realizado por Zanton et al. (2014) se concluye que el rendimiento de grasa láctea fue significativamente afectado por la suplementación

de HMBTA en comparación con las fuentes de metionina protegida (MPR), así como la concentración de grasa láctea. La suplementación con HMTBA suele tener un efecto en la fermentación ruminal lo que induce a un incremento en rendimiento de grasa láctea asociado al incremento en bacterias celulolíticas, en raciones que contenían 50% de concentrado de acuerdo con Hansen et al. (1991), también Sharma y Erdman (1988) especularon que suplementar Met produce mayores rendimientos de grasa láctea a partir de la colina sintetizada de Met de forma parcial, a estas causas se pueden atribuir los resultados encontrados.

Producción y composición de proteína láctea

Los resultados encontrados no fueron significativos ($P>0,05$) para la producción y composición de proteína láctea en los tratamientos APC y BPC, sin embargo la tendencia fue positiva ($P<0,10$) en contenido de proteína láctea en el tratamiento BPC+HMTBA, y negativa ($P>0,10$) para los tratamientos APC (Cuadro 6 y Figura 4).

La suplementación de HMBTA no ha sido constante en el incremento de contenido y rendimiento de proteína láctea (Zanton et al. 2014). Dato que se confirma con las investigaciones realizadas por Rulquin et al. (2006), Whelan et al. (2011) y Klangnok et al. (2011), donde mencionan que la ineffectividad en aumentar la proteína láctea se debe a la incapacidad de incrementar la concentración plasmática de Met por parte de los análogos como HMTBA o HMBi, asociado al bajo impacto de la Met a nivel intestinal. Otras de las causas ante los resultados negativos al adicionar este aditivo encontradas en la literatura se pueden atribuir a la etapa de la lactancia (Schwab et al. 1992), ya que su efecto positivo se registra, en su mayoría, a inicios de lactancia. En el presente experimento las vacas se encontraron en 136 días de lactancia (mediana lactancia), por lo que éste no fue un factor contraproducente.

Sin embargo St-Pierre y Sylvester (2005) y Phipps et al. (2008), encontraron un incremento en rendimiento y contenido de proteína láctea en temprana lactancia utilizando HMBi pero no al utilizar HMTBA, atribuible a las

elevadas concentraciones plasmáticas de Met (Rulquin y Delaby 1997), lo que permitió incrementar la síntesis de proteína láctea por la glándula mamaria (Schwab 1995). Como se observa en la Figura 4, la respuesta en contenido de proteína láctea fue positiva en el nivel estándar de proteína cruda durante el período de experimentación.

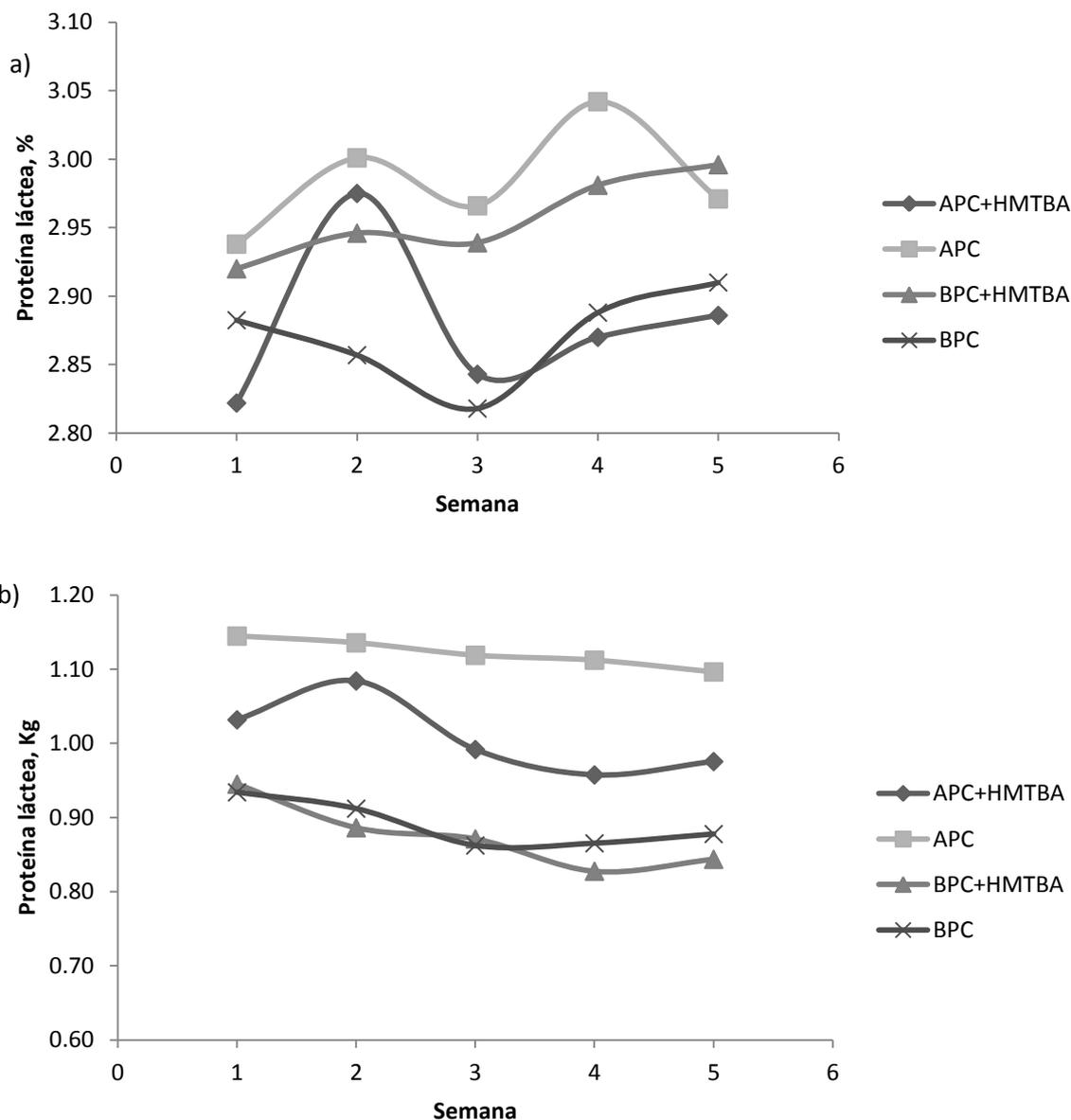


Figura 4. Efecto de suplementación HMTBA sobre el contenido de proteína láctea a) y rendimiento de proteína láctea b), en los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFP™, NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC (15,8% PC + 25g de MFP™, NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).

En el presente estudio no fue posible cuantificar la fermentación ruminal, producción de ácidos grasos volátiles (AGV) ni concentraciones plasmáticas de Met, para verificar realmente las causas de las tendencias encontradas, tampoco se encontró en la literatura trabajos adicionando Met ante elevados niveles de PC dietética. Sin embargo un elevado aporte de energía respecto a la proteína de la dieta (Cuadro 7), y el elevado valor de NUL en los tratamientos APC, indican que pudo haber existido una interferencia a nivel de fermentación ruminal y producción de AGV por lo que la tendencia positiva ($P < 0,10$) en las variables respuestas se obtuvo con niveles estándar de PC en la dieta, es decir raciones balanceadas.

Cuadro 7. Relación energía proteína de las dietas.

Ítem	Tratamientos ¹			
	APC+HMTBA	APC	BPC+HMTBA	BPC
PC (g/día)	3.256,54	3.296,96	2.784,42	2.793,10
EM (Mcal/día)	50,56	51,26	45,16	45,3
Relación PC:EM	64,29	64,32	61,50	61,5
NUL (mg/dL)	21,10	20,30	17,95	18,17

¹ En los diferentes tratamientos APC+HMTBA (16,6% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA); APC (16,6% PC); BPC+HMTBA (15,8% PC + 25g de MFPTM, NOVUS International Inc., USA) y BPC (15,8% PC).

En los resultados obtenidos se observó una disminución en los parámetros estudiados durante la semana 4 (Figura 2, 3 y 4), situación que pudo deberse al incremento en las lluvias durante esa semana, factor que provoca un incremento en el contenido de humedad de los forrajes, lo que a su vez acelera la tasa de pasaje en tracto digestivo, afectando la producción y composición de sólidos totales, por lo que la acción de HMTBA pudo afectarse. El corto período de experimentación impidió conocer el efecto de HMTBA durante ese período estacional.

Adición de HMTBA y excreción de nitrógeno (NUL)

Los tratamientos con APC reflejan valores de NUL superiores a los tratamientos con BPC (Cuadro 6), los valores de NUL están relacionados con la concentración de PC en la dieta (Jonker et al. 1998). Al adicionar el aditivo en

APC el NUL se incrementa y al hacerlo en BPC disminuye (Cuadro 6), sin embargo los resultados no fueron significativos ($P>0,05$).

El actual conocimiento en nutrición de AA en rumiantes apoya el concepto que cuando un AA esencial es absorbido en el perfil de AA como requerimiento del animal, el requerimiento por el total de AA es reducido y la eficiencia de AA para la síntesis de proteína es maximizado (NRC 2001). El adicionar Met en una dieta deficiente permite mejorar el perfil de AA absorbidos, resultando en un incremento de síntesis de proteína. El alimentar con HMTBA permitió observar ese concepto en los tratamientos con un nivel estándar de PC (BPC) al disminuir el valor de NUL, no así con APC (Cuadro 6), resultado que es apoyado por St-Pierre y Sylvester (2005) y Chen et al. (2011), quienes al adicionar HMTBi lograron disminuir el valor de NUL y mejorar la eficiencia de N.

Análisis de factibilidad

Se realizó un análisis económico con el objetivo de conocer el ingreso por concepto de venta de leche, ante el costo de las dietas incluyendo el costo del aditivo utilizado. El precio de la leche y sus componentes son los reportados por la Cooperativa de Productores de Leche Dos Pinos R.L al día 4 de junio del año 2014. Los resultados se muestran en el Cuadro 8.

Como se observa en el cuadro 8, en los tratamientos APC se percibe un mayor ingreso neto debido a la mayor producción de las vacas. Así como no existieron diferencias significativas ($P>0,05$) en las variables respuesta al adicionar el aditivo HMTBA, tampoco permite ver una retribución económica en el ingreso neto o rentabilidad en los tratamientos APC.

Cuadro 8. Análisis de costos: beneficio.

Ítem	Precio, ₡/Kg	Dieta			
		APC+HMTBA	APC	BPC+HMBTA	BPC
Leche, Kg		35,01	37,60	29,60	31,01
Grasa, ₡	2.415,22	2.655,61	2.910,95	2.545,06	2.403,93
Proteína, ₡	2.415,18	2.434,38	2.709,14	2.113,51	2.150,16
Otros Sólidos, ₡	1.966,88	3.705,18	4.040,73	3.096,03	3.345,29
Ingreso		8.795,17	9.660,82	7.754,60	7.899,38
Consumo MS, Kg		19,48	20,13	17,97	17,60
Costo dieta ₡/día		4.166,26	4.186,27	3.449,02	3.484,37
Tratamiento ₡/día		51,80	0	51,80	0
Costo ₡/animal/día		4.218,06	4.186,27	3.500,82	3.484,37
Ingreso neto		4.577,11	5.474,55	4.253,78	4.415,01
Rentabilidad %		44,76	56,66	54,85	55,89

Respecto a los BPC, no se percibe un efecto positivo debido a que la adición de HMTBA no provoca un incremento en la cantidad de sólidos totales vendibles. Por lo que tampoco existe una retribución económica al adicionar HMTBA. La utilidad mostrada incluye únicamente los costos de alimentación, no se incluyeron otros rubros.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se comprobó que el adicionar HMTBA en dietas deficientes de metionina, cuya fuente proteica proviene de la harina de soya y forraje Kikuyo (*Kikuyochloa clandestinum*), permite incrementar el aporte de este aminoácido como porcentaje de la proteína metabolizable.

El adicionar HMTBA a vacas en pastoreo no permitió observar una respuesta significativa ($P > 0,05$) en la producción de leche, leche corregida al 4% de grasa ni componentes lácteo en dos niveles de PC (15,8% y 16,6%). Sin embargo contenido de grasa y proteína láctea presentaron una tendencia positiva ($P < 0,10$) en niveles estándar de PC (15,8%).

El utilizar dietas con elevado nivel de PC, incrementa el nivel de NUL, respecto a niveles estándar de PC. El adicionar HMTBA no permite disminuir ese nivel con niveles estándar de PC.

No se encontró una retribución económica ante el uso de HMTBA debido a que no se incrementó la cantidad de leche y sólidos totales vendibles en ambos niveles de PC dietética.

RECOMENDACIONES

En caso de repetir el presente trabajo, se recomienda ampliar los días de experimentación con el objetivo de conocer el efecto de HMTBA en un tiempo prolongado. Así como utilizar un número mayor de animales.

También se recomienda realizar la prueba en una misma estación meteorológica, con el objetivo de evitar interferencias fisiológicas por el cambio de clima.

Otro aspecto que podría ser tomado en cuenta es utilizar el aditivo en estudio en otra raza lechera, con el objetivo de conocer sus efectos.

LITERATURA CITADA

- ALBERTS B., BRAY D., HOPKIN K., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., WALTER P. 2004. Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana. Segunda Edición. Madrid, España. 711 pp.
- AOAC.1990. Official Methods of AnaLisis. Vol. I. 15th ed. Assoc, Office. Anal. Chem. Arlington. VA.
- ARDAILLON P., CHRISTIAN P. 1994. Process for coating active principles using a pH-sensitive polymer. Patente N. US5296219 A. Accesado el 5 de octubre del 2013. En: <https://www.google.com/patents/US5296219>.
- ARMENTANO L.E., SWAIN S. M., DUCHARME, G. A. 1993. Lactation response to ruminally protected methionine and Lisine at two amounts of ruminally available nitrogen. J. Dairy Sci. 76(10): 2963–9.
- ARROYO J.G. 1992. Utilización de diferentes niveles de MHA (Hidroxianálogo de Metionina) sobre producción y composición de la leche en vacas en pastoreo durante el verano. Tesis presentada para optar por el título de licenciatura en ingeniería agronómica con énfasis en zootecnia. UCR. San Pedro de Montes de Oca, Costa Rica.
- BARTOMOLEO M.P., MAISANO F. 2006. Validation of a Reversed-Phase HPLC Method for Quantitative Amino Acid Analysis. J. Biomol Tech. 17(2): 131-137.
- BEQUETTE B.J., BACKWELL F.R.C., CROMPTON L.A. 1998. Current Concepts of Amino Acid and Protein Metabolism. J. Dairy Sci. 81(9): 2540–2559.
- BERTHIAUME R., THIVIERGE M.C., PATTON R.A., DUBREUIL P., STEVENSON M., MCBRIDE B.W., LAPIERRE H. 2006. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 89(5): 1621–34.
- BREMMER D.R., OVERTON T.R., CLARK J.H. 1997. Production and composition of milk from Jersey cows administered bovine somatotropin and fed ruminally protected amino acids. J. Dairy Sci. 80(7): 1374–80.
- CHALUPA W., SNIFFEN C. J. 1996. Protein and amino acid nutrition of lactating Dairy cattle-today and tomorrow. Animal Feed Science and Technology. 58: 65-75.
- CHALUPA W. 1975. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. J. Dairy Sci. 58(8): 1198-1218.
- CHEN Z.H., BRODERICK G.A., LUCHINI N.D., SLOAN B.K., DEVILLARD E. 2011. Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on

- milk production and N-utilization in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(4): 1978–88.
- D' MELLO J.P.F. 2003. *Amino acids in Animal Nutrition*. CABI. Segunda Edición. Oxon United Kindom. 495 pp.
- DINN N.E., SHELFORD J., FISHER L.J. 1998. Use of the Cornell net carbohydrate and protein system and rumen-protected Lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81(1): 229–37.
- DORMOND H., ROJAS A., BOSCHINI C. 1990. Efecto de la DL-Metionina sobre parámetros productivos en vacas de doble propósito. *Agronomía Costarricense*. 14(1): 31-36.
- EDMUNDS B., SÜDEKUM K.-H., SPIEKERS H., SCHUSTER M., SCHWARZ, F. J. 2012. Estimating utilizable crude protein at the duodenum, a precursor to metabolizable protein for ruminants, from forages using a modified gas test. *Animal Feed Science and Technology*. 175:3-4.
- FRANDSON R.D., WILKE W. LEE., DEE FAILS A. 2003. *Anatomy and Physiology of farm animals*. 6th edition. Blackwell Publishing.
- GUO K., RUSSEK-COHEN E., A.VARNER M., KOHN, R. A. 2004. Effects of Milk Urea Nitrogen and Other Factors on Probability of Conception of Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87(6): 1878–1885.
- HARGRAVES J.N.G., KERR J.D. 1978. *Botanal: a comprehensive sampling and computing procedure for estimating pasture yield and composition*. II. Computational package. Division of Tropical Crops and Pastures, CSIRO. Brisbane, Australia. 88 p.
- HANSEN W.P., OTTERBY D.E., LINN J.G., DONKER, J.D. 1991. Influence of forage type, ratio of forage to concentrate, and methionine hydroxy analog on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 74:1361–1369.
- JONKER J. S., R. A. KOHN, R. A. ERDMAN. 1998. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2681–2692.
- JOHNSON-VANWIERINGEN L. M., HARRISON J. H., DAVIDSON D., SWIFT M. L., VON KEYSERLINGK M.A G., VAZQUEZ-ANON, M., CHALUPA, W. 2007. Effects of rumen-undegradable protein sources and supplemental 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid and lysine-HCl on lactation performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90(11):5176–88.

- KLANGNOK P., LOUNGLAWAN P., SUKSOMBAT W. 2011. Effects of met hydroxy analog (MHA ®) supplementation of dairy cow's diets on milk yield and milk composition. *Suranaree J. Sci. Technol.* 18(2):99-108.
- KOENIG K.M., RODE L.M. 2001. Ruminal degradability, intestinal disappearance, and plasma methionine response of rumen-protected methionine in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84(6): 1480–7.
- KOENIG K.M., RODE L.M., KNIGHT C.D., VÁZQUEZ-AÑÓN M. 2002. Rumen degradation and availability of various amounts of liquid methionine hydroxy analog in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85(4): 930–8.
- LANZAS C., BRODERICK G.A, FOX D.G. 2008. Improved feed protein fractionation schemes for formulating rations with the cornell net carbohydrate and protein system. *J. Dairy Sci.* 91(12): 4881–4891.
- LAPIERRE, H., VÁZQUEZ-AÑÓN, M., PARKER, D., DUBREUIL, P., HOLTROP, G., LOBLEY, G. E. 2011. Metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate (HMTBA) in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94(3):1526–35.
- LEONARDI C., STEVENSON M., ARMENTANO L. E. 2003. Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86(12): 4033–42.
- MAHECHA L., ANGULO J., MANRIQUE L. 2002. Predicción del peso vivo a través del perímetro torácico en la raza bovina Lucerna. *Rev Col Pec.* 15(1): 88-91.
- MARTÍN-VENEGAS R., BRUFAU M.T., GUERRERO-ZAMORA A.M., MERCIER Y., GERAERT P.-A., FERRER R. 2013. The methionine precursor DL-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid protects intestinal epithelial barrier function. *J. Food chemistry.* 141(3): 1702–9.
- METCALF J. 2001. Understanding bypass vegetable proteins. *Feed Mix Magazine.* 9(4):15-16.
- MJOUN K., KALSCHEUR K.F., HIPPEN A.R., SCHINGOETHE D.J. 2010. Ruminal degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in soybean and corn distillers grains products. *J. Dairy Sci.* 93(9):4144–54.
- NRC. 1985. *Rumiant Nitrogen Usage.* The National Academis. Accesado el 1 Octubre del 2013. En: <http://www.nap.edu/catalog/615.html>.
- NRC. 2001. *National Research Council. Nutrients Requeriments of Dairy Cattle.* 7th ed. Natinal Academy Press. Washington D.C.
- PAPAS A.M., SNIFFEN C.J., MUSCATO T.V. 1984. Effectiveness of Rumen-Protected Methionine for Delivering Methionine Postruminally in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 67(3):545–552.

- PATTERSON J., L KUNG. 1988. Metabolism of DL-methionine and methionine analogs by rumen microorganisms. *J. Dairy Sci.* 71(12):3292–301.
- PIEPENBRINK M. S., OVERTON T. R., CLARK J. H. 1996. Response of cows fed a low crude protein diet to ruminally protected methionine and Lysine. *J. Dairy Sci.* 79(9): 1638–46.
- PHIPPS R.H., REYNOLDS C.K., GIVENS D.I., JONES A.K., GERAERT P., DEVILLARD E., BENNETT R. 2008. Short communication: effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester on milk production and composition of lactating Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91(10):4002–5.
- POLAN C.E., CUMMINS K.A., SNIFFEN C.J., MUSCATO T.V., VICINI J.L., CROOKER B. A., PEIRCE-SANDNER S.B. 1991. Responses of Dairy Cows to Supplemental Rumen-Protected Forms of Methionine and Lysine. *J. Dairy Sci.* 74(9):2997–3013.
- RATHBONE M.J., GURNY R. 2000. *Controlled Release Veterinary Drug Delivery. Biological and Pharmaceutical Considerations.* ELSEVIER SCIENCE B.V. Amsterdam, Netherlands. 375p.
- ROBINSON P.H. 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable Lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livestock Science.* 127(2-3): 115–126.
- RULQUIN H., DELABY L. 1997. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. *J. Dairy Sci.* 80(10):2513–22.
- RULQUIN H., GRAULET B., DELABY L., ROBERT J.C. 2006. Effect of different forms of methionine on lactational performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89(11): 4387–94.
- SÁNCHEZ., J. 2002. Proteína cruda en los pastos tropicales. Accesado el 8 de septiembre del 2014. En: <http://www.feednet.ucr.ac.cr/bromatologia/pcpt.htm>.
- SAS INSTITUTE. 2004. *SAS/STAT 9.1 User's Guide.* Version 9.1 ed. SAS Institute Inc., Cary, N.C. 5121 p.
- SCHWAB C.G., BOZAK C.K., WHITEHOUSE N. L., MESBAH M.M. 1992. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. *J. Dairy Sci.* 75(12):3486–502.
- SCHWAB C.G. 1995. Rumen protected amino acids – their role in nutrition of high producing ruminants. Pages 161–175 in *Animal Science Research and Development: Moving Toward a New Century.* M. Ivan, ed. Can. Soc. Anim. Sci., Ottawa, ON, Canada.

- SHARMA B.K., ERDMAN R.A. 1988. Abomasal infusion of choline and methionine with or without 2-amino-2-methyl-1-propanol for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71(9):2406–2411.
- ST-PIERRE N.R., SYLVESTER J.T. 2005. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 88:2487–97.
- SUAVANT D., PEREZ JEAN-MARC., TRAN GILLES. 2004. Tablas de composición de valor nutritivo de las materias primas destinadas a los animales de interés ganadero. Edición Mundi Prensa. 305 pp.
- VAN AMBURGH M., CHASE L.E., HIGGS R. J. 2010. Feeding Low Crude Protein Rations to Dairy Cows. Department of Animal Science Cornell University. 32–43.
- VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. 1991. Methods for Dairy fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597.
- WANG C., LIU H. Y., WANG Y. M., YANG Z. Q., LIU J.X., WU Y.M., YE H.W. 2010. Effects of dietary supplementation of methionine and lysine on milk production and nitrogen utilization in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93(8):3661–70.
- WHELAN S.J., MULLIGAN F.J., FLYNN B., MCCARNEY C., PIERCE, K.M. 2011. Effect of forage source and a supplementary methionine hydroxy analog on nitrogen balance in lactating dairy cows offered a low crude protein diet. *J. Dairy Sci.* 94(10): 5080–9.
- WITTCOFF H., REUBEN B., PLOTKIN J.S. 2013. Industrial Organic Chemicals. WILEY. 3 ed Edición. New Jersey, E.U.A. 775 p.
- XU S., HARRISON J.H., CHALUPA W., SNIFFEN C., JULIEN W., SATO H., FUJIEDA T. 1998. The effect of ruminal bypass Lysine and methionine on milk yield and composition of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81(4): 1062–77.
- ZANTON G.I., BOWMAN G.R., VÁZQUEZ-AÑÓN M., RODE L.M. 2014. Meta-analysis of the lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. *J. Dairy Sci.* 97:1–17.

