

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**EFFECTO DE LISINA Y METIONINA HERBALES PROTEGIDAS, EN EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CORDEROS EN CRECIMIENTO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA:

M en C. ANGÉLICA VALERIA LORENZANA MORENO

COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR: DR. FERNANDO XICOTÉNCATL PLATA PÉREZ

CO DIRECTOR: DR. AUGUSTO CESAR LIZARAZO CHAPARRO

ASESORA: DRA. MARÍA EUGENIA DE LA TORRE HERNÁNDEZ

**EFFECTO DE LISINA Y METIONINA HERBALES PROTEGIDAS EN EL
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE CORDEROS EN CRECIMIENTO**

La presente tesis fue realizada bajo la supervisión del comité tutorial indicado a continuación y aprobada como requisito en el plan de estudios para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

COMITÉ TUTORAL:

Director

Dr. Fernando Xicoténcatl Plata Pérez



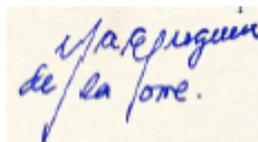
Co director

Dr. Augusto Cesar Lizarazo Chaparro



Asesora

Dra. María Eugenia De La Torre Hernández



ÍNDICE GENERAL

		Página
1	Resumen	1
1.1	Abstract	2
2	Introducción	3
3	Preguntas de investigación	6
4	Objetivo general	7
4.1	Objetivos particulares	7
5	CAPÍTULO 1. Cinética de liberación de nitrógeno amoniacal y fermentación ruminal de aditivos para piensos a base de hierbas con aminoácidos	9
6	CAPÍTULO 2. Comparación de una mezcla herbal con lisina protegida en rumen; efecto en el crecimiento de corderos, conteo de protozoarios y química sanguínea	28
7	CAPÍTULO 3. Comportamiento productivo y metabólico de ovinos alimentados con diferentes fuentes y dosis de metionina protegida	47
8	CAPÍTULO 4. Cambios en la microbiota ruminal de corderos suplementados con diferentes fuentes y dosis de lisina y metionina herbal protegida	64
9	Conclusiones generales	83
10	Referencias	84

RESUMEN

El objetivo de este proyecto fue caracterizar la composición química, los parámetros de cinética de fermentación ruminal y estimar la degradación de la proteína *in vitro* de dos aditivos herbales (elaboradas con *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*; LH, OptiLysine®, y con *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*; MH, OptiMethionine®), comparándolos con alfalfa (*Medicago sativa*) y pasta de soya (*Glycine max*), como fuentes estándar de proteína., asimismo se compararon diferentes niveles de dichos aditivos herbales con fuentes sintéticas de lisina (LS) y metionina (MS) (AjiPro®-L y Mepron®, respectivamente) protegidas de la degradación ruminal, en el comportamiento productivo y metabólico de corderos en crecimiento. Finalmente, se evaluaron los cambios en la microbiota ruminal al utilizar diferentes niveles de MH en la alimentación de dichos corderos en crecimiento. La concentración de N-NH₃ de las mezclas herbales fue menor ($P < 0.05$) que las fuentes de proteínas estándar, lo que indica que la proteína presente en ellas podría resistir la degradación ruminal. La complementación con LH y LS por sí solos, no mejoraron el crecimiento de los corderos pero sí afectaron las poblaciones de protozoos del rumen. Sin embargo, al hacer la complementación de LS con diferentes niveles de MH y MS, conforme se incrementó la dosis del aditivo, mejoró linealmente la repuesta productiva de los corderos respecto al control ($p \leq 0.05$), sin presentar diferencias entre dichas fuentes de metionina, con excepción del consumo de materia seca. Lo que indica que tanto la mezcla herbal, como la MS, mejoran el crecimiento de corderos post-destete. Los resultados de la abundancia de bacterias con MH muestran que hay cambios en diferentes Clases y Familias, contribuyendo con parte de los efectos positivos que se observan en el comportamiento productivo de los corderos.

ABSTRACT

The objective of this project was to characterize the chemical composition, the rumen fermentation kinetics parameters and to estimate *in vitro* degradation of the protein of two herbal additives, comparing them with alfalfa (*Medicago sativa*) and soybean meal (*Glycine max*), as standard protein sources. The herbal mixtures tested are made with *Phaseolus mango* and *Linum usitatissimum* (LH, OptiLysine®), and with *Trigonella foenum-graecum* and *Allium sativa* (MH, OptiMethionine®). In addition different levels of these herbal additives were compared with synthetic sources of lysine. (LS) and methionine (MS) (AjiPro®-L and Mepron®, respectively) protected from ruminal degradation, in the productive and metabolic performance of growing lambs. Finally, the changes in the ruminal microbiota were evaluated when using different levels of MH in the feeding of these growing lambs. The N-NH₃ concentration of the herbal mixtures was lower (P <0.05) than the standard protein sources, indicating that the protein present in them could resist ruminal degradation. Supplementation with LH and LS alone did not improve lamb growth but did affect rumen protozoan populations. However, when completing the LS supplementation with different levels of MH and MS, the productive response of the lambs improved linearly with respect to the control (p <0.05), as the additive dose was increased, without differences between these sources of methionine, except for the dry matter intake. This indicates that both, herbal mixture and MS improve the growth of post-weaning lambs. The results of the abundance of bacteria with MH show that there are changes in different Classes and Families, contributing part of the effects observed in the positive effects on performance in lambs.

INTRODUCCIÓN

La ovinocultura es una actividad que se ha desarrollado en México desde hace varios siglos. En los inicios del siglo XIX, cuando se fraccionaron las grandes superficies de pastoreo, transformándolas en áreas de cultivo, se afectó en gran medida la producción y productividad nacional, marginándola a los sectores más pobres de la población, caracterizados por estar en manos de pequeños productores con escaso acceso a insumos y tecnologías modernas y orientándose básicamente a la subsistencia. Sin embargo, en la actualidad la producción ovina se efectúa poniendo mayor atención en el flujo de capital financiero, dando origen a una producción pecuaria empresarial muy promisoriosa (Cuellar, 2007).

El confinamiento de las ovejas es una alternativa interesante para obtener un producto de excelente calidad durante todo el año. Sin embargo, estos sistemas requieren una mayor inversión (Prado *et al.*, 2015). En los últimos años, se ha presentado un incremento de los costos de producción del ganado debido al considerable aumento de los precios de los granos de cereal y pastas de oleaginosas (Vasta y Luciano, 2011). Por lo que, para que este sistema pueda ser viable, se deben utilizar algunas herramientas de producción como: razas o cruzas especializadas en la producción de carne, así como aditivos alimenticios (Prado *et al.*, 2015), entre ellos los aminoácidos protegidos.

La nutrición animal ha venido siendo cada vez más precisa con el objetivo de lograr la máxima eficiencia al menor costo e impacto ambiental (Vargas y Elizondo, 2015). En los rumiantes, los aminoácidos absorbidos en el intestino delgado provienen de la proteína microbiana, así como de la proteína dietaria no degradable en rumen (Obeidat *et al.*,

2008). Los alimentos que se utilizan comúnmente para alimentar a los rumiantes cumplen con los requisitos de proteína degradable en el rumen, pero presentan un déficit de proteínas no degradables (Araújo *et al.*, 2019b); por esta razón, en la formulación de raciones para rumiantes, es necesario considerar que la proteína dietaria no degradable en rumen contribuya con los aminoácidos que complementen el aporte de la síntesis microbiana (Raja *et al.*, 2017). Los aminoácidos son requeridos sobre un patrón ideal para cubrir las necesidades fisiológicas de los animales en las diferentes etapas fisiológicas (Vargas y Elizondo, 2015). En este sentido, la metionina y lisina son considerados los aminoácidos limitantes más importantes en la producción de rumiantes (Prado *et al.*, 2015; Mendoza *et al.*, 2011). La metionina es importante para producir formilmetionina (fMet) que, al igual que la lisina, tienen como principal función la síntesis de proteína (Vargas y Elizondo, 2015; Ordway y Aines, 2010). Para que estos aminoácidos esenciales puedan mejorar el comportamiento productivo de los animales, deben ser administrados de tal forma que sean resistentes a la degradación microbiana y queden disponibles para la absorción en el intestino (Oke *et al.*, 1986). Sin embargo, el uso de metionina y/o lisina protegidas para mejorar el comportamiento productivo del ganado ha causado controversia y resultados inconsistentes (Obeidat *et al.*, 2008). En algunas investigaciones se ha visto que el uso de metionina y/o lisina protegidas, puede mejorar la respuesta productiva del animal, tanto en producción de leche como en ganancia de peso y conversión alimenticia (Giallongo *et al.*, 2016; Torre y Caja, 1998). Por otro lado, Mendoza *et al.* (2011) reportan pérdidas de peso al administrar niveles intermedios de metionina (2.5 y 3.5 g por animal día⁻¹) en ciervo rojo. Mientras que otros autores no han encontrado efectos sobre el comportamiento

productivo del animal a diferentes dosis (Obeidat *et al.*, 2008, Prado *et al.*, 2015). La principal presentación de estos aminoácidos protegidos es sintética que, en muchas ocasiones, resulta en un aumento a los costos de producción, volviéndose inaccesible para diversas unidades de producción. Como alternativa a esta situación, se presentan los aminoácidos protegidos de fuentes vegetales, que resultan más económicos. Diversas leguminosas herbáceas como *Phaseolus* spp y *Trigonella* spp tienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos (principalmente taninos) y otros metabolitos secundarios, que pueden proteger la proteína de la degradación ocasionada por los microorganismos ruminales, afectar algunas poblaciones de bacterias y mejorar la eficiencia de fermentación ruminal, constituyéndose en aditivos naturales (Knowless *et al.*, 2017; Manh *et al.*, 2012), sin embargo, no existen reportes científicos sobre su efecto en el comportamiento productivo. De acuerdo con lo anterior y teniendo en cuenta la escasa literatura reportada sobre la evaluación de aminoácidos protegidos herbales, se planteó el presente proyecto con la intención de determinar la respuesta productiva del uso de diferentes fuentes de lisina y metionina protegidas de la degradación ruminal en corderos en crecimiento.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Se obtendrá la misma magnitud de respuesta en los parámetros productivos de ovinos en crecimiento con fuentes herbales de aminoácidos protegidos que con fuentes sintéticas?

¿Las fuentes herbales de aminoácidos protegidos modificarán la composición y estructura de las poblaciones de bacterias y protozoarios ruminales?

¿Cuáles serán las dosis de lisina y metionina, utilizados como aditivos, óptimas para el mejor crecimiento de corderos?

OBJETIVO GENERAL

Determinar las dosis óptimas de fuentes de lisina y metionina de sobrepaso para ovinos en crecimiento.

Objetivos particulares

1. Analizar la composición química parcial y la cinética de la degradación de la materia seca, así como estimar la degradación ruminal de dos fuentes de mezclas herbales que contienen aminoácidos limitantes (Lys y Met).
2. Comparar el efecto de diferentes niveles de un aditivo herbal (*Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*, OptiLysine® de Nuproxa México, Indian Herbs) y una fuente de lisina protegida (AjiPro®-L), sobre el crecimiento de corderos, parámetros sanguíneos y cambios en población de protozoarios ruminales.
3. Comparar el efecto de diferentes niveles de un aditivo herbal (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*, OptiMethionine® de Nuproxa México, Indian Herbs) con una fuente de metionina sintética protegida en rumen (Mepron®) en el comportamiento productivo y metabólico de corderos en crecimiento.
4. Determinar los cambios en la microbiota ruminal de corderos en crecimiento al utilizar diferentes niveles de un aditivo herbal (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*, OptiMethionine® de Nuproxa México, Indian Herbs).

PUBLICACIONES

1. Lorenzana M.A., De la Torre H.M., Lizarazo C.A., Plata P.F., Miranda R.L., Martínez G.A. & Mendoza M.G. 2020. **Ruminal ammonia concentration and fermentation kinetics of commercial herbal feed additives with amino acids**. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo. Publicado en línea el 06/11/2020 en:
<http://revistas.uncu.edu.ar/ojs3/index.php/RFCA/article/view/4130>;
actualmente está en prensa la versión impresa.
2. Lorenzana M.A., Lizarazo C.A., De la Torre H.M., Plata P.F. & Mendoza M.G. 2020. **Comparison of a Polyherbal Mixture with a Rumen-Protected Lysine on Lamb Growth, Protozoan Count and Blood Chemistry**. International Journal of Agriculture and Biological Sciences. 04:32 – 39. DOI: 10.5281/zenodo.3986575

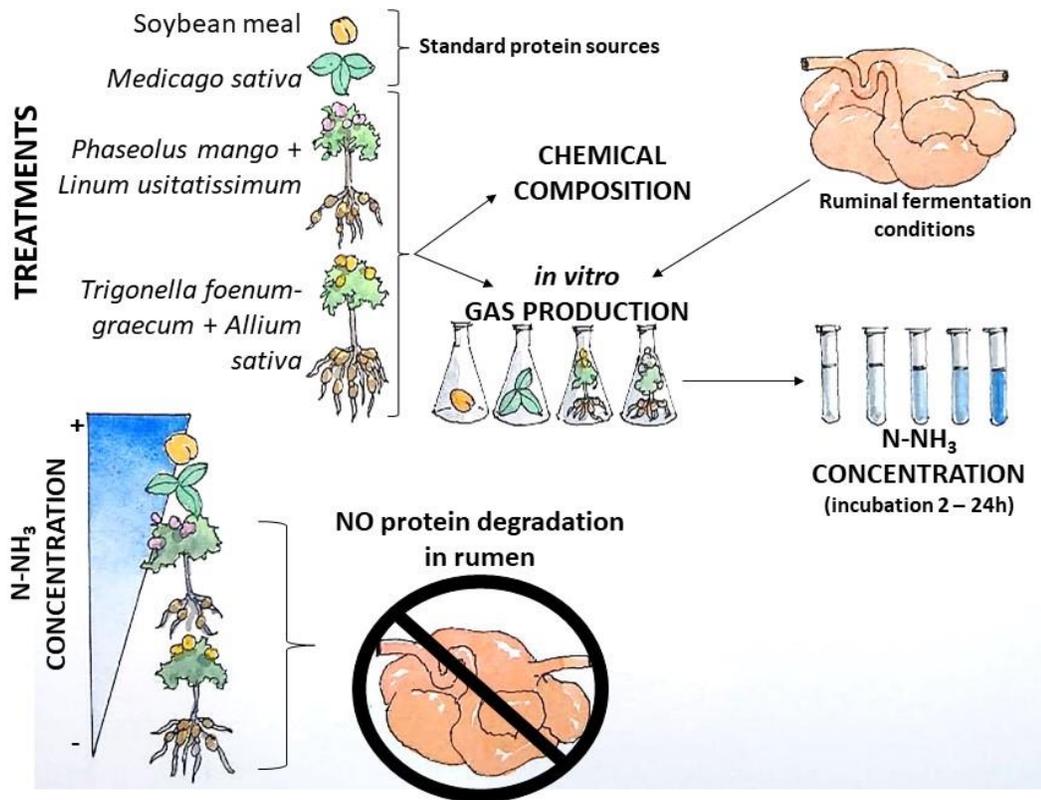
CAPÍTULO 1

CINÉTICA DE LIBERACIÓN DE NITRÓGENO AMONIACAL Y FERMENTACIÓN RUMINAL DE ADITIVOS PARA PIENSOS A BASE DE HIERBAS CON AMINOÁCIDOS

RESUMEN

El objetivo del estudio fue caracterizar la composición química, estimar la degradación *in vitro* de la proteína (a partir de la concentración de N amoniacal) y los parámetros de cinética de fermentación ruminal de dos aditivos herbales. Las mezclas herbales probadas están elaboradas con *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*, para aportar lisina (Lis), y con *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*, para aportar metionina (Met), mismas que fueron comparadas con alfalfa (*Medicago sativa*) y pasta de soya extraída con solvente (*Glycine max*), como fuentes estándar de proteína, usando la técnica de producción de gas *in vitro* modificada para liberación de N-NH₃, estimando la cinética de fermentación y la digestibilidad de materia seca (72 h) en un diseño completamente al azar, con prueba de medias de Tukey. La concentración de N amoniacal de las mezclas herbales fue menor (P<0.05) que las fuentes de proteínas estándar, lo que indica que su proteína podría resistir la degradación ruminal. Los aditivos herbales con Lis o Met mostraron una concentración mínima de N-NH₃ en las primeras 4 h de incubación; a las 8 h la liberación, para dichos productos fue de 0.27 y 0.54 mg dL⁻¹, respectivamente, menor (P<0.05) que la pasta de soya extraída con solvente y alfalfa (1.15 y 2.24 mg dL⁻¹, respectivamente).

RESUMEN GRÁFICO



INTRODUCCIÓN

La estimación de la degradación de la proteína para la evaluación de los alimentos y el cálculo del valor de la proteína de escape de un ingrediente en particular es necesario para formular de forma más certera las dietas y satisfacer los requisitos de los rumiantes (Hedqvist y Udén, 2006; Reis *et al.*, 2016). Los aminoácidos absorbidos en el intestino delgado de los rumiantes se derivan de la proteína microbiana y de la proteína dietaria que escapa a la degradación ruminal. En rumiantes jóvenes destetados, el menor tamaño del rumen (en comparación con el adulto), llega a limitar el consumo de

materia seca y, en consecuencia, la síntesis de proteína microbiana, por lo que el flujo duodenal de aminoácidos microbianos puede no ser el adecuado para desarrollar el máximo potencial de crecimiento (Raja *et al.*, 2017; Reis *et al.*, 2016). Además, la composición de la proteína que llega al intestino delgado es de gran relevancia, dado que la proteína microbiana se considera limitada en el aporte de ciertos aminoácidos como lisina, metionina y treonina, para rumiantes en crecimiento (Coomer *et al.*, 1993; Torrentera *et al.*, 2017). Por lo anterior, la proteína dietaria no degradable en rumen debe contener aminoácidos que permitan complementar la contribución microbiana (Raja *et al.*, 2017, Soltan *et al.*, 2012).

La proteína de los productos vegetales se degrada extensamente en el rumen, pero diversas leguminosas herbáceas como *Phaseolus spp* y *Trigonella spp* tienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos (principalmente taninos) y otros metabolitos secundarios que pueden proteger la proteína de la degradación ocasionada por los microorganismos ruminales, afectar algunas poblaciones de bacterias y mejorar la eficiencia de fermentación ruminal constituyéndose en aditivos naturales (Knowless *et al.*, 2017; Manh *et al.*, 2012). Estos productos podrían aumentar la cantidad de aminoácidos que se absorben a nivel intestinal. Sin embargo, la evidencia sobre la degradación ruminal y la caracterización de este tipo de especies es escasa. Por lo que el objetivo del presente estudio fue caracterizar dos mezclas comerciales de hierbas que contienen aminoácidos limitantes (Lys y Met), analizar su composición química parcial, estimar la degradación ruminal de la proteína, utilizando la concentración de nitrógeno amoniacal ruminal, caracterizar la cinética de la degradación de la materia seca en el rumen con la técnica de producción de gas *in vitro* y compararlas con

alimentos conocidos como fuentes estándar de proteína (alfalfa y pasta de soya extraída con solvente).

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos mezclas de hierbas: una elaborada a base de *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum* (como fuente de lisina herbal; LH) y otra elaborada a base de *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa* (como fuente de metionina herbal; MH), se compararon con alfalfa (*Medicago sativa*) y pasta de soya (*Glycine max*), como fuentes estándar de proteína. Los cuatro sustratos de proteína (LH, MH, alfalfa y pasta de soya extraída con solvente) se probaron de forma independiente.

OptiMethionine® y OptiLysine®, correspondientes a MH y LH respectivamente, fueron proporcionados por Nuproxa México (Indian Herbs y Nuproxa Switzerland). Estos aditivos herbales para alimentación animal son productos estandarizados y tienen mezclas certificadas, siguiendo las normas ISO 9001 y GMP (*Good Manufacturing Practices*).

La composición de los productos herbales se determinó utilizando la metodología establecida por la A.O.A.C. (2007): porcentaje de humedad (Hum) (método 934.01), proteína bruta (PB) por el método Kjeldahl ($N \times 6.25$) (método 954.01), extracto etéreo (EE) (método 920.39) y cenizas (Cen) por calcinación a 550 ° C (método 923.03). Las determinaciones de fibra de detergente neutro (FDN) y fibra de detergente ácido (FDA) se realizaron utilizando la técnica de Van Soest *et al.* (1991).

La producción de gas *in vitro* se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Theodorou *et al.* (1994), modificada para medir el nitrógeno amoniacal. La recolección de líquido ruminal se hizo en un toro Holstein de aproximadamente 5 años y 600 Kg de PV, por medio de una cánula, antes de que el bovino fuera alimentado (07:00 h). Una vez recolectado, el líquido ruminal se filtró por ocho capas de gasa y se mantuvo en baño María a 39 °C y continuamente saturado con CO₂. Posteriormente, en frascos de vidrio ámbar de 125 mL se colocaron 0.5 g de muestra. La presión de gas se midió a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h de incubación, utilizando un manómetro manual (escala 0 a 1 Kg cm⁻²). Las unidades de presión (Kg cm⁻²) se transformaron a volumen y la producción acumulada de gas se ajustó al modelo propuesto por Menke y Steingass, 1988. Las variables de la cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vmax), fase de retardo (L) y tasa de producción de gas (S), se obtuvieron mediante el modelo logístico de Pitt *et al.* (1999). Para estimar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se usó el residuo de los frascos de las 72 horas de incubación; se filtraron con papel Waltham No. 41 y se secaron a 55 °C por 48 h.

Para determinar el N-NH₃, se extrajeron 1.2 mL de líquido ruminal de cada frasco en incubación en la prueba de producción de gas *in vitro* (antes descrita) a las 2, 4, 8, 12 y 24 h de incubación, los cuales se mezclaron con 0.3 mL de ácido metafosfórico y se mantuvieron en congelación (-18 °C). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,100 x g durante 5 minutos en una centrífuga Mini-spin eppendorf y el sobrenadante se utilizó para la determinación de N-NH₃, con la reacción fenol - hipoclorito (McCullough H, 1967). Las lecturas se realizaron a 630 nm con un espectrofotómetro (Cary 100 UV-VIS). Los resultados se multiplicaron por el factor de dilución de la

muestra (4:1). La incubación se realizó dos veces. Cada ensayo contenía tres réplicas por sustrato probado y sus respectivos blancos.

El diseño experimental fue completamente al azar con 4 tratamientos (LH, MH, pasta de soya extraída con solvente y alfalfa) y 6 repeticiones por variable (Vmax, L, S, K0.5, DIVMS, así como la concentración de N-NH₃ a 4, 8, 12 y 24 horas). Cada frasco utilizado en las pruebas de producción de gas se consideró una unidad experimental. Los datos se analizaron con el software estadístico JMP (Sall *et al.*, 2012) y las medias se compararon con la prueba de Tukey (P <0.05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La composición química parcial de las mezclas herbales fue similar entre ellas (Tabla 1). Considerando que en su formulación contienen al menos una leguminosa (*P. mango* o *T. foenum-graecum*), se podría esperar que el porcentaje de proteína cruda fuera mayor al que se determinó en esta investigación, ya que es una característica relevante de esta familia vegetal (Kan *et al.*, 2017; Santacoloma *et al.*, 2017; Soltan *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce la proporción exacta en la que se encuentran presentes dichas leguminosas, así como qué partes de la planta se utilizaron para hacer la mezcla herbal. Pinto *et al.* (2010), mencionaron que la composición química del forraje puede verse afectada por especie, edad del forraje, órgano de la planta (frutos u hojas), sitio de crecimiento y tipo de suelo, entre otros. Las mezclas herbales probadas están certificadas por un análisis de formulación de aminoácidos (lisina o metionina).

Tabla 1. Composición química parcial de las mezclas herbales.

Determinación	Lisina herbal (LH)	Metionina herbal (MH)
Materia seca (%)	96.0	97.8
Materia orgánica (%)	92.6	85.0
Proteína cruda (%)	8.2	9.2
FDN (%) †	52.6	44.1
FDA (%) †	33.1	25.9
Extracto etéreo (%)	6.7	4.8
Calcio (%)	1.44	0.97
Fósforo (%)	0.44	0.54
Metionina (g 100g ⁻¹ proteína)	1.74	5.23
Lisina (g 100g ⁻¹ proteína)	11.19	0.81
EM (Mcal Kg ⁻¹) ††	2.57	3.02

† FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, EM: energía metabolizable.

†† Estimada con ecuaciones de la digestibilidad *in vitro* (Osorio *et al.*, 2015)

Kassi *et al.* (2000) señalaron que altas concentraciones de fibra detergente neutro (FDN) en el forraje se asocian con menor ingesta y, altas concentraciones de fibra detergente ácido (FDA), se asocian con baja digestibilidad ruminal, ambas características son poco deseables en forrajes utilizados para la alimentación animal, lo cual se ve reflejado en los resultados de DIVMS de la Tabla 2. Las leguminosas como *P. mango* presentan una ventaja sobre otros forrajes, ya que lignifican principalmente en los tallos y no tanto en las hojas, como lo hacen la gran mayoría de las gramíneas utilizadas para el pastoreo. Por lo tanto, se observa una mayor estabilidad en la calidad

nutricional del forraje de las especies de leguminosas leñosas a lo largo del tiempo (Botero y Russo, 1998). Estas mezclas herbales tienen una presentación finamente molida, por lo que el aporte de FDN efectiva es bajo, con efectos mínimos en la ingesta o digestión.

Las leguminosas se consideran una buena fuente de proteína, aminoácidos esenciales (como lisina, leucina, isoleucina, fenilalanina y valina), ácidos grasos insaturados (como los ácidos linolénico y linoleico), fibra dietética, minerales (Ca, Fe y Zn) y vitamina C (Arros *et al.*, 2020; Galindo y Marrarero, 2005; Guzmán *et al.*, 2000; Kan *et al.*, 2017), así como de diversos metabolitos secundarios. En este sentido, las especies incluidas en las mezclas evaluadas proporcionan una gran diversidad de dichos metabolitos. El género *Phaseolus* contiene inhibidores de proteasa, ácido fítico (Espinosa *et al.*, 2006) y polifenoles, así como taninos condensados y flavonoides (glucósidos de antocianina: cianidina, definidina y pelargonidina) (Espinosa *et al.*, 2006; Kan *et al.*, 2017). *L. usitatissimum* contiene aceites poliinsaturados, principalmente ácido linolénico, así como compuestos polifenólicos, llamados lignanos, con actividad antioxidante (Beltagi *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2009). La leguminosa *T. foenum-graecum*, tiene efectos antioxidantes debido a que contiene glutatión, β -carotenos y α -tocoferol, además de taninos, alcaloides y saponinas, particularmente diosgenina (Mukthamba *et al.*, 2016; Wani y Kumar, 2018). Finalmente, *A. sativum* es una fuente rica de aceites esenciales y compuestos organosulfurados, como la alicina, con actividades antimicrobianas específicas. Los fenoles totales, taninos condensados y aceites esenciales presentes en esta planta parecen ser metabolitos secundarios biológicamente activos, que modifican

la fermentación ruminal (Knowless *et al.*, 2017; Lawal *et al.*, 2016; Patra *et al.*, 2011) y explican la resistencia a la degradación de proteínas en la incubación *in vitro*.

Los parámetros de fermentación ruminal se muestran en la Tabla 2. Como se puede observar, la pasta de soya fue la que presentó mayor producción de gas, probablemente debido al tipo de carbohidratos presentes en el sustrato ya que, tanto en la alfalfa como en las mezclas herbales, predomina la celulosa. Soto *et al.* (1994) encontraron que la adición de péptidos y aminoácidos no tuvo efecto sobre los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* cuando las bacterias crecen en sustratos ricos en celulosa. Aunque no es estadísticamente significativa, la producción de gas de lisina herbal fue menor que la de metionina herbal, coincidiendo con Hernández *et al.* (2010), quien explicó que las hojas con menor valor energético generan menos gas *in vitro*.

Tabla 2. Parámetros de cinética de fermentación ruminal *in vitro* y digestibilidad de mezclas herbales y fuentes proteicas.

Parámetro	Fuente [†]				
	LH	MH	PS	A	EEM
Vmax ⁷² (mL g ⁻¹)	292.07 ^b	327.77 ^{ab}	340.67 ^a	290.43 ^b	7.541
S (h ⁻¹)	0.038 ^c	0.044 ^{ab}	0.039 ^{bc}	0.046 ^a	0.0012
L (h)	0.83 ^c	1.06 ^c	2.22 ^b	2.97 ^a	0.265
K _{0.5} (h)	18.46 ^a	15.59 ^{bc}	17.47 ^{ab}	15.04 ^c	0.472
DIVMS ⁷² (%)	75.60 ^d	83.89 ^b	97.69 ^a	78.51 ^c	2.565

[†]LH: lisina herbal, MH: metionina herbal, PS: pasta de soya, A: alfalfa. Vmax: volumen máximo, S: tasa fraccional, L: fase de retardo, K_{0.5}: tiempo requerido para obtener la mitad del volumen máximo, DIVMS: digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Medias con literales distintas en una hilera son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$); EEM: error estándar de la media.

En general, se ha observado que los forrajes tienen una fase de retardo más prolongada, especialmente cuando son de baja calidad (Amjed *et al.*, 1992), sin embargo, aunque los compuestos herbales analizados en el presente estudio tienen una composición similar a la de cualquier otro forraje, tienen una fase de retardo muy corta, menor a la determinada para la pasta de soya y para la alfalfa, esto se puede presentar cuando los forrajes son tiernos y se podría explicar por la alta proporción de contenidos celulares, con relación a las paredes celulares.

La Tabla 3 muestra que la concentración de N-NH₃ alcanzada por las mezclas herbales (LH y MH) fue muy baja durante las primeras 12 h de incubación en comparación con los estándares proteicos, los cuales presentaron una liberación constante desde la hora 4 de incubación. Raab *et al.* (1983) y Lorenz *et al.* (2011) reportan la concentración de N-NH₃ liberado como una forma de estimar la degradación de la proteína en rumen, por lo tanto, estos resultados implicarían que parte de la proteína contenida en dichos forrajes es resistente a la degradación ruminal.

La velocidad en la degradación de la proteína dietaria a nivel ruminal depende de múltiples factores. Bach *et al.* (2005) mencionan a la estructura proteica, a la interacción con otros nutrientes y a la actividad proteolítica de la microbiota ruminal, como algunos de los factores clave. Sin embargo, también la presencia de inhibidores enzimáticos o de factores antinutricionales pueden influir en la degradación de las proteínas (McSweeney *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2020). Los factores antinutricionales más estudiados son los taninos, seguidos de los metabolitos vegetales secundarios como las saponinas, compuestos cianogénicos, lecitinas, alcaloides, ácido oxálico y flavonoides (Hu *et al.*, 2005; Kamra *et al.*, 2006; Mendoza *et al.*, 2020). Estos factores

pueden influir en la degradación y síntesis de proteínas ruminales, ya sea al afectar directamente a los microorganismos ruminales, o por su interacción con los nutrientes (Castro *et al.*, 2017; Knowless *et al.*, 2017; McSweeney *et al.*, 2001).

Tabla 3. Concentración ruminal de N-NH₃ (mg dL⁻¹) de mezclas herbales y fuentes proteicas incubadas *in vitro*.

Hora	Fuente [†]				
	LH	MH	PS	A	EEM
0	0	0	0	0	
4	0.00 ^c	0.02 ^c	1.15 ^b	2.24 ^a	0.154
8	0.27 ^b	0.54 ^b	2.76 ^a	3.33 ^a	0.339
12	0.34 ^b	0.57 ^b	5.19 ^a	4.75 ^a	0.245
24	4.23 ^b	3.43 ^b	16.94 ^a	6.74 ^b	1.233

[†]LH: lisina herbal, MH: metionina herbal, PS: pasta de soya, A: alfalfa. Medias con literales distintas en la misma fila son estadísticamente diferentes (Tukey $p \leq 0.05$), EEM: Error estándar de la media.

Las plantas como *P. mango*, *T. foenum-graecum* y *A. sativum*, contienen cantidades significativas de taninos condensados, los cuales reaccionan con las proteínas y forman complejos tanino-proteína mediante puentes de hidrógeno, interacciones hidrófobas, enlaces iónicos y enlaces covalentes (Rodríguez *et al.*, 2007). Estos complejos pueden afectar a las enzimas secretadas por las bacterias e inhibir la fermentación de los carbohidratos y proteínas (Henke *et al.*, 2017). Además, los taninos afectan la proteólisis ruminal ya que pueden asociarse con las proteínas solubles de la dieta, protegiéndolas de la acción microbiana (Castro *et al.*, 2017; Henke *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2007).

Se ha reportado que 100 g de *T. foenum-graecum* proporcionan 4.63 g de saponinas (Aasim *et al.*, 2018; Wani y Kumar, 2018). A su vez, Hu *et al.* (2005) encontraron que, cuando se incrementa la cantidad de saponinas en una fermentación *in vitro*, disminuye de manera importante la concentración de nitrógeno amoniacal. Wang *et al.* (2000) también observaron una disminución en el N-NH₃ al incluir, tanto en la alimentación de ovinos como en pruebas *in vitro*, a la *Yucca schidigera*, la cual se considera un producto rico en saponinas.

Existen metabolitos secundarios que se han identificado como reductores de la población protozoaria, como: los polifenoles totales, los taninos condensados y las saponinas, todos reportados como metabolitos secundarios presentes en los forrajes utilizados en las mezclas herbales analizadas en el presente estudio. Galindo y Marrarero (2005) reportaron el efecto de *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Gliricidia sepium*, *Sapindus saponaria* y otras plantas sobre protozoos ciliados en el rumen. Dado que los protozoos tienen altos requerimientos de proteína para su mantenimiento, las concentraciones ruminales de N-NH₃ disminuyen con la defaunación, esto se ha considerado ventajoso en dietas bajas en proteínas (Nhan *et al.*, 2001).

La disminución de la degradación ruminal de las proteínas presentes en las mezclas herbales (Tabla 3) representa una ventaja. Coomer *et al.* (1993) y De Almeida *et al.* (2016) afirmaron que complementar la dieta de los rumiantes jóvenes con proteína ruminal no degradable puede aumentar el flujo de proteína y aminoácidos al tracto gastrointestinal posterior, por lo tanto, aumentar el suministro de proteína metabolizable. Estas mezclas herbales podrían usarse como aditivos, no como

suplemento proteico, ya que, de acuerdo con diversos autores, la concentración óptima para la síntesis de proteína microbiana es de 4 a 10.0 mg de N-NH₃ 100 mL⁻¹ de líquido ruminal, además de proporcionar la energía disponible para el ecosistema ruminal (Nolan and Dobos, 2005; Satter and Slyter, 1974). Las concentraciones de amoníaco de las mezclas herbales en las primeras 12 h estuvieron por debajo de estos valores en comparación con los ingredientes utilizados como estándares proteicos (Tabla 3).

Galindo y Marrarero (2005) mencionan que algunas leguminosas poseen proteínas solubles altamente degradables en rumen, por lo que es necesario garantizar la energía suficiente para que se produzca la adecuada síntesis de proteína microbiana o la inclusión de agentes protectores a la proteólisis ruminal de la misma, lo cual no es necesario con el uso de los compuestos herbales en estudio, ya que la concentración ruminal de N-NH₃ se ha utilizado para estimar la degradación del rumen (Raab *et al.*, 1983) y los corderos suplementados con lisina a base mezclas herbales han mejorado el crecimiento (Mejía *et al.*, 2019), lo que confirma la resistencia a la degradación en el rumen de dichos aditivos.

CONCLUSIÓN

Las concentraciones de amoníaco encontradas en el presente estudio implicarían que parte de la proteína contenida en estos forrajes es resistente a la degradación en el rumen. Las mezclas herbales evaluadas podrían utilizarse como aditivos en la alimentación de rumiantes, siendo fuente de proteína no degradable en rumen. Sin

embargo, el uso potencial como fuentes de aminoácidos para rumiantes necesita una evaluación adicional, con el fin de estimar su degradación en todo el tracto digestivo.

REFERENCIAS

- Aasim, M.; Baloch, F. S.; Nadeem, M. A.; Bakhsh, A.; Sameeullah, M.; Day, S. 2018. Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): An underutilized edible plant of modern world. *In: Global perspectives on underutilized crops*. M. Ozturk, R. Hakeem, M. Ashraf, and M. Ahmad (eds). Springer. Cham. p: 381-408.
- Amjed, M.; Jung, H. G.; Donker, J. D. 1992. Effect of alkaline hydrogen peroxide treatment on cell wall composition and digestion kinetics of sugarcane residues and wheat straw. *J. Anim. Sci.* 70(9): 2877-2884.
- A.O.A.C. 2007. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 17th ed. Washington. D.C. USA.
- Arros, F.; Garrido, C.; Valenzuela, C. 2020. Development and characterization of nettle-leaves powder (*Urtica urens*) as a potential supplement for animal feed. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 52(1): 353-359.
- Bach, A.; Calsamiglia, S.; Stern, M. D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 88: E9-E21.
- Beltagi, H. S.; Salama, Z. A.; El-Hariri, D. M. 2007. Evaluation of fatty acids profile and the content of some secondary metabolites in seeds of different flax cultivars (*Linum usitatissimum* L.). *Gen. Appl. Plant Physiology.* 33(3-4): 187-202.
- Botero, R.; Russo, R. 1998. Utilización de árboles y arbustos fijadores de nitrógeno en sistemas sostenibles de producción animal en suelos ácidos tropicales. (FAO). *Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica.* <http://www.fao.org/ag/aga/agap/FRG/AGROFOR1/Agrofor1.htm> (Fecha de consulta: 30/07/2019).
- Castro, M. J.; Westreicher, K. E.; Henke, A.; Diaby, M.; Susenbeth, A.; Dickhoefer, U. 2017. *In vitro* microbial protein synthesis, ruminal degradation and post-ruminal

- digestibility of crude protein of dairy rations containing Quebracho tannin extract. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102(1): 77-86.
- Coomer, J. C.; Amos, H. E.; Froestschel, M. A.; Ragland, K. K.; Williams, C. C. 1993. Effects of supplemental protein source on ruminal fermentation, protein degradation and amino acid absorption in steers and on grow and feed efficiency in steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 71(11): 3078-3086.
- De Almeida, L. M.; Detmann, E.; Gomes, D. I.; Reis, W. L.; Batista, E. D.; Campos, V. S.; Paulino, M. F. 2016. Intake, digestibility and nitrogen utilization in cattle fed tropical forage and supplemented with protein in the rumen, abomasum, or both. *J. Anim. Sci. Biotech.* 7(1): 11.
- Espinosa, A. L.; Lygin, A.; Widholm, J. M.; Valverde, M. E.; Paredes, L. O. 2006. Polyphenols in wild and weedy Mexican common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Agric Food Chem.* 54(12): 4436-4444.
- Gagnon, N.; Cortes, C.; Da Silva, D.; Kazama, R.; Benchaar, C.; Dos Santos, G.; Zeoula, L.; Petit, H. V. 2009. Ruminal metabolism of flaxseed (*Linum usitatissimum*) lignans to the mammalian lignan enterolactone and its concentration in ruminal fluid, plasma, urine and milk of dairy cows. *Br. J. Nutr.* 102(7): 1015-1023.
- Galindo, J.; Marrarero, Y. 2005. Manipulación de la fermentación ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 39: 439-450.
- Guzmán, M. S.; Acosta, G. J.; Paredes, L. O. 2000. Protein and mineral content of a novel collection of wild and weedy common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *J. Sci. Food Agric.* 80(13): 1874-1881.
- Hedqvist, H.; Udén, P. 2006. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126(1-2): 1-21.
- Henke, A.; Dickhoefer, U.; Westreicher-Kristen, E.; Knappstein, K.; Molquentin, J.; Hasler, M.; Susenbeth, A. 2017. Effect of dietary Quebracho tannin extract on feed intake, digestibility, excretion of urinary purine derivatives and milk production in dairy cows. *Arch. Anim. Nutr.* 71(1): 37-53.
- Hernández, H. J.; Guerra F. J.; Camacho, R. J.; Villarreal, E. O.; Pedraza, O. R.; Plata, P. F.; Mendoza, M. G. 2010. Evaluación de vainas y hojas de árboles forrajeros por la técnica de producción de gas *in vitro*. *Zootecnia. Trop.* 28(3): 421-426.

- Hu, W. L.; Liu, J. X.; Ye, J. A.; Wu, Y. M.; Guo, Y. Q. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120(3-4): 333-339.
- Kamra, D. N.; Agarwal, N.; Chaudhary, L. C. 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series.* 1293: 156-163.
- Kan, L.; Nie, S.; Hu, J.; Wang, S.; Cui, W. S.; Li, Y.; Xu, S.; Wu, Y.; Wang, J.; Bai, Z.; Xie, M. 2017. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 108: 467-477.
- Kassi, A. L.; Newbold, C. J.; Wallace, R. J. 2000. Chemical composition and degradation characteristics of foliage of some African multipurpose trees. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86(1-2): 27-37.
- Knowless, M. M.; Pabón, M. L.; Hess, H. D.; Carulla, J. E. 2017. Changes in *in vitro* ruminal and postruminal degradation of tropical tannin rich legumes due to varying levels of polyethylene glycol. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 101(14): 641-648.
- Lawal, B.; Shittu, O. K.; Oibiokpa, F. I.; Mohammed, H.; Umar, S. I.; Haruna, G. M. 2016. Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *J. Acute Disease.* 5(4): 296-301.
- Lorenz, M. M.; Karlsson, L.; Hetta, M.; Udén, P. 2011. Recycling of microbial N estimation of protein degradation by *in vitro* gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170(1-2): 111-116.
- Manh, N. S.; Wanapat, M.; Uriyapongson, S.; Khejornsart, P.; Chanthakhoun, V. 2012. Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. *Afr. J. Agric. Res.* 7(13): 1997-2003.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clín. Chim. Acta.* 17(2): 297-304.
- McSweeney, C. S.; Palmer, B.; McNeill, D. M.; Krause, D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91(1-2): 83-93.
- Mejía, D. M.; Mendoza, M. G.; Lee, R. H.; Osorio, T. A.; Hernández, G. P. 2019. Effect of an herbal lysine source on lamb's growth. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* 17(1):199.

- Mendoza, G. D.; Oviedo, M. F.; Pinos, J. M., Lee-Rangel, H. A.; Vázquez, A.; Flores, R.; Pérez, F.; Roque, A.; Cifuentes, O. 2020. Milk production in dairy cows supplemented with herbal choline and methionine. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 52(1): 332-343.
- Menke, K.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from the chemical analysis and the in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.* 28, 9-52.
- Mukthamba, P.; Srinivasan, K. 2016. Hypolipidemic and antioxidant effects of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and garlic (*Allium sativum*) in high-fat fed rats. *Food Biosci.* 14: 1-9.
- Nhan, N. T.; Hon, N. V.; Ngu, N. T.; Von, N. T.; Preston, T. R.; Leng, R. A. 2001. Practical application of defaunation of cattle on farms in Vietnam: response of young cattle fed rice straw and grass to a single drench of groundnut oil. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 14(4): 485-490.
- Nolan, J. V.; Dobos, R. C. 2005. Nitrogen Transactions in Ruminants. In: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism.* 2nd Edition. CAB International. Wallingford, UK. p. 137
- Osorio, T. I.; Mendoza, G. D.; Plata, F. X.; Martínez, J. A.; Vargas, L.; Ortega, G. C. 2015. A simulation model to predict body weight gain in lambs fed high-grain diets. *Small Rumin Res.* 123(2- 3): 246-250.
- Patra, A. K.; Kamra, D. N.; Bhar, R.; Kumar, R.; Agarwal, N. 2011. Effect of *Terminalia chebula* and *Allium sativum* on in vivo methane emission by sheep. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 95(2): 187-191.
- Pinto, R.; Hernández, D.; Gómez, H.; Cobos, M. A.; Quiroga, R.; Pezo, D. 2010. Árboles forrajeros de tres regiones ganaderas de Chiapas, México: usos y características nutricionales. *Universidad y Ciencia.* 26(1): 19-31.
- Pitt, R. E.; Cross, T. L.; Pell, A. N.; Schofield, P.; Doane, P. H. 1999. Use of in vitro gas production models in ruminal kinetics. *Math. Biosci.* 159(2): 145-163.
- Raab, L.; Cafantaris, B.; Jilg, T.; Menke, K. H. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 50(3): 569-582.

- Raja, A. I.; Abbasi, F.; Abd, M. E.; Abdel-Lafit, M. A.; Soomro, R. N.; Hayat, K.; Mohamed, M. A.; Bodinga, B. M.; Yao, J.; Cao, Y. 2017. Critical analysis of excessive utilization of crude protein in ruminants ration: impact on environmental ecosystem and opportunities of supplementation of limiting amino acids-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(1): 181-190.
- Reis, W. L.; Detmann, E.; Batista, E. D.; Rufino, L. M.; Gomes, D. I.; Bento, C. B.; Mantovani, H. C.; Valladares, F. S. 2016. Effects of ruminal and post-ruminal protein supplementation in cattle fed tropical forages on insoluble fiber degradation, activity of fibrolytic enzymes, and the ruminal microbial community profile. *Anim. Feed Sci. Technol.* 218: 1-16.
- Reyes-Gutiérrez, J. A.; Montañez-Valdez, O. D.; Guerra-Medina, C. E.; Ley de Coss, A. 2020. Effect of protein source on *in situ* digestibility of sugarcane silage-based diets. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 52(1): 344-352.
- Rodríguez, R.; Sosa, A.; Rodríguez, Y. 2007. Microbial protein synthesis in rumen and its importance to ruminants. *Cuban J. Agric. Sci.* 41(4): 287-294.
- Sall, J.; Lehman, A.; Stephens, M.; Creighton, L. 2012. *JMP® Start Statistics: A Guide to Statistics and Data Analysis.* 5th ed. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Santacoloma, V. L.; Granados, M. J.; Aguirre, F. S. 2017. Evaluación de variables agronómicas, calidad del forraje y contenido de taninos condensados de la leguminosa *Lotus corniculatus* en respuesta a biofertilizante y fertilización química en condiciones agroecológicas de trópico alto andino colombiano. *Entramado.* 13(1): 222-233.
- Satter, L. D.; Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32: 199-208.
- Soltan, Y. A.; Morsy, A. S.; Sallam, S. M.; Louvandini, H.; Abdalla, A. L. 2012. Comparative *in vitro* evaluation of forage legumes (*Prosopis*, *Acacia*, *Atriplex* and *Leucaena*) on ruminal fermentation and methanogenesis. *J. Anim. Feed Sci.* 21(4): 759-772.
- Soto, R. C.; Muhammed, S. A.; Newbold, C. J.; Stewart, C. S.; Wallace, R. J. 1994. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep

- receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria in vitro. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49(1-2): 151-161.
- Theodorou, M. K.; Williams, B. A.; Dhanoa, M. S.; McAllan, A. B.; France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48(3-4): 185-197.
- Torrentera, N.; Carrasco, R.; Salinas-Chavira, J.; Plascencia, A.; Zinn, R. A. 2017. Influence of methionine supplementation of growing diets enriched with lysine on feedlot performance and characteristics of digestion in Holstein steer calves. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 30(1): 42-50.
- Van Soest, P. V.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74(10): 3583-3597.
- Wang, Y.; McAllister, T. A.; Yanke, L. J.; Xu, Z. J.; Cheeke, P. R.; Cheng, K. J. 2000. *In vitro* effects of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on rumen microbial protein synthesis and ruminal fermentation. *J. Sci. Food Agric.* 80(14): 2114-2122.
- Wani, S. A.; Kumar, P. 2018. Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *J. Saudi Society Agric Sci.* 17(2): 97-106.

CAPÍTULO 2

COMPARACIÓN DE UNA MEZCLA HERBAL CON LISINA PROTEGIDA EN RUMEN; EFECTO EN EL CRECIMIENTO DE CORDEROS, CONTEO DE PROTOZOARIOS Y QUIMICA SANGUINEA

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto que tienen diferentes niveles de una mezcla polihierbal (*Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*, OptiLysine® de Nuproxa México, Indian Herbs) con una lisina protegida de la degradación ruminal (LPR, AjiPro®-L) en el crecimiento de corderos, cambios en el conteo de protozoarios ruminales y bioquímica sanguínea. 56 corderos Pelibuey x East Friesian (peso vivo inicial 21.97 Kg \pm 4.29) fueron asignados aleatoriamente a tratamientos que consistieron en un grupo de control o tres dosis diarias de fuentes de lisina: mezcla herbal (5, 10 y 15 g d⁻¹) y LPR (5, 10 y 15 g d⁻¹), dosificados diariamente por vía oral durante 45 días. Los corderos fueron alimentados individualmente con una ración basal (13.2% PC, 2.26 Mcal EM Kg⁻¹) con un flujo duodenal estimado en dieta basal de 6.45 g d⁻¹ de lisina y 2.32 g d⁻¹ de metionina. Los niveles de ambas fuentes no afectaron el comportamiento productivo con excepción del consumo que mostró respuesta cuadrática con la LPR (p<0.05). La mezcla herbal estimuló linealmente la población de Entodinos (p<0.10) y redujo la de Holotricos (p <0.05), mientras que la LPR redujo linealmente la de Holotricos (p<0.05). En la bioquímica sanguínea, la mezcla herbal sólo afectó a la deshidrogenasa láctica en forma cuadrática (p<0.05), mientras que la LPR

aumentó la fosfatasa alcalina (lineal $p < 0.05$) y redujo la globulina (efecto cuadrático, $p < 0.05$). Los resultados indican que la mezcla herbal y la lisina protegida de la degradación ruminal, no mejoraron el crecimiento de los corderos, pero sí afectaron las poblaciones de protozoos del rumen.

INTRODUCCIÓN

Se han reconocido como aminoácidos (AA) limitantes para el crecimiento de animales jóvenes a la lisina y a la metionina (NRC, 2007; Smolin y Grosvenor, 2012) y, dentro de los AA limitantes, estos son considerados como los más importantes en la producción de rumiantes (Flores *et al.*, 2009; Prado *et al.*, 2015; Mendoza *et al.*, 2012). En la formulación de raciones, es necesario considerar que la proteína dietaria no degradable en rumen complementa a los aminoácidos aportados por la proteína microbiana (Raja *et al.*, 2017). Se ha suplementado lisina protegida de la degradación ruminal (LPR) a corderos en crecimiento con resultados variables (Araújo *et al.*, 2019; Prado *et al.*, 2015), por lo que no se tienen estimaciones de los requerimientos de lisina y metionina tan precisas como las que se tienen para ganado lechero (Lara *et al.*, 2006; Vyas y Erdman, 2009), sin embargo, dado que la lisina es un aminoácido esencial requerido para la síntesis de proteínas corporales y se considera el primer aminoácido limitante en la mayoría de las especies domésticas (Smolin y Grosvenor, 2012), es importante evaluar las fuentes disponibles para corderos en crecimiento.

Debido a que se ha considerado que la lisina y la metionina son aminoácidos necesarios para el crecimiento óptimo y la síntesis de leche en el ganado lechero (Socha *et al.*,

2005), las fuentes de metionina protegida han estado disponibles en forma comercial desde hace varios años, sin embargo, las de lisina son recientes. El grado de protección de los productos de sobrepaso ruminal se ha estimado con técnicas *in situ* o *in vitro* (NRC, 2001; Lara *et al.*, 2003) pero, para productos de LPR, hay poca información disponible. Watanabe *et al.* (2003) estimaron un escape de lisina ruminal de 58.3%, mientras que Swanepoel (2009) reportó del 19 al 24%. Se asume que los ingredientes con los que se protegen los aminoácidos no afectan a la microbiota ruminal, pero muchos productos tienen varios compuestos que incluyen ácidos grasos polinsaturados (Ardailon *et al.*, 1989; Ardailon and Franzoni, 1992) que pueden afectar a los protozoarios.

Por otro lado, las mezclas herbales elaboradas con plantas que tienen altas concentraciones de compuestos polifenólicos (principalmente taninos) y otros metabolitos secundarios, pueden conferir protección contra la degradación proteica causada por los microorganismos ruminales y suministrar aminoácidos esenciales. Sin embargo, los metabolitos también podrían afectar a la microbiota positiva o negativamente, dependiendo de la dosis (Jouany y Morgavi, 2007). Los protozoos ruminales pueden alterar cuantitativamente la degradación ruminal de las proteínas de la dieta y el crecimiento bacteriano ruminal, modificando consecuentemente el suministro de proteínas de origen dietario y bacteriano a nivel duodenal, por lo que es importante conocer los posibles cambios en las poblaciones de estos microorganismos ruminales, de acuerdo con la dieta proporcionada. En este sentido, los protozoarios ciliados ruminales se componen de dos órdenes, ambos en la clase *Vestibulifera*:

holotricos, pertenecientes a la familia *Isotrichidae*, y entodinomorfos pertenecientes a la familia *Ophryoscolecidae* (Jouany, 1996).

Finalmente, es importante mencionar que algunas evaluaciones de productos herbales han demostrado que estos pueden tener efectos sobre el comportamiento productivo al utilizarlos como aditivos en la alimentación animal; un experimento con corderas en crecimiento, recibiendo una mezcla polihierbal compuesta de *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*, mostró que se mejoró el consumo, el peso final y la ganancia diaria de peso a medida que aumentaba la dosis del producto herbal de 0 a 20 g d⁻¹ (Mejía-Delgadillo *et al.*, 2019).

Por lo anterior, el objetivo del presente experimento fue comparar el efecto de diferentes niveles de inclusión de una mezcla polihierbal (*Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*) vs una fuente de lisina protegida de la degradación ruminal sobre el crecimiento de corderos, sus parámetros sanguíneos y los cambios en la población de protozoarios ruminales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usó la mezcla polihierbal compuesta de *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum* (OptiLysine® de Nuproxa México, Indian Herbs) y como lisina protegida de la degradación ruminal (LPR), el Monohidrocloreuro de L-Lisina (AjiPro®-L de Animal Nutrition North America, Inc., Chicago). El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la UNAM (CDMX, México) con 56 corderos Pelibuey x East Friesian (peso vivo inicial 21.97

Kg \pm 4.29), que fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos que consistieron en grupo control o tres dosis diarias de la mezcla polihierbal (5, 10 y 15 g d⁻¹) o de la LPR (5, 10 y 15 g d⁻¹) durante 45 días, alimentados en forma individual con una ración basal (base seca) que contenía: grano de maíz (34.0%), rastrojo de maíz (55.3%), melaza de caña (6.0%), urea (2.7%) y premezcla mineral (2.0%) con 2.26 Mcal EM Kg⁻¹ y 13.2% de PC. Se estimó un flujo duodenal de 6.45 g d⁻¹ de lisina y 2.32 g d⁻¹ de metionina para dicha ración basal. Las dosis de la mezcla polihierbal y LPR se administraron diariamente en forma individual; para asegurar el consumo exacto se utilizó como vehículo una mezcla previamente elaborada con 750 g de harina de maíz, 50 g de melaza y 100 mL de agua (56 dosis). Antes de iniciar el experimento los corderos fueron desparasitados, bacterinizados y tuvieron un período de adaptación de 15 días a la dieta experimental.

El día 45 del periodo experimental, se tomó una muestra de líquido ruminal, previa a la alimentación, mediante una sonda esofágica; una vez colectado el líquido ruminal, se filtró por 8 capas de gasa. Las muestras se diluyeron con 200 mL L⁻¹ de glicerol, se tiñeron usando la solución de Lugol 1:1 (D'agosto and Carneiro, 1999) y se guardaron en refrigeración para su posterior conteo en microscopio. Después de la tinción (mínimo 4 horas), se realizó el pipeteo para su conteo, por sextuplicado, en una cámara Sedgewick-Rafter (Dehority, 1984).

Se usaron muestras de la mezcla polihierbal para determinar el contenido de lisina por cromatografía líquida Ultra Performance (UPLC, por sus siglas en inglés) en el Laboratorio de Química y Análisis de alimentos de la Facultad de Química de la UNAM. El contenido de lisina fue de 11.19 g de Lis 100g⁻¹ de proteína, mientras que la LPR

contenía, de acuerdo con su ficha técnica, 50% de lisina, 49% de grasa y 1% de lecitina de soya en base seca.

Al término del periodo de prueba se colectaron aproximadamente 5 mL de sangre de cada cordero mediante venopunción yugular. Estas muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para separar el suero, el cual se extrajo con una micropipeta de precisión y se almacenó a 5°C para su posterior análisis de laboratorio. Las concentraciones de glucosa, urea, ácido úrico, colesterol, proteína total, albúmina, globulina, bilirrubina, creatinina, fosfatasa alcalina (ALP), deshidrogenasa láctica (DHL), aspartato aminotransferasa (AST), calcio y fósforo se determinaron mediante la técnica de fotometría automatizada en el laboratorio de análisis clínicos veterinarios (LACLIVET).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con ocho repeticiones por tratamiento. Para probar los efectos lineales y cuadráticos de cada fuente de lisina, los datos se analizaron por medio de polinomios ortogonales (Mirman, 2014), mientras que los efectos generales de los productos herbal y sintético se compararon con contrastes ortogonales. Se usó el peso inicial como covariable para las variables peso final, ganancia diaria de peso (GDP), consumo de materia seca (MS) y eficiencia alimenticia, además de bloquear por sexo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se detectaron efectos de ninguna de las dos fuentes de lisina en las variables de comportamiento productivo ($p > 0.05$; Tabla 1), aunque numéricamente los mejores

resultados mostraron que la GDP se incrementó en 5% utilizando 10 g de la mezcla polihierbal y en 7% con 15 g de LPR.

Tabla 1. Efecto del tipo y dosis diaria de lisina en el comportamiento productivo de corderos en crecimiento.

Producto	Dosis de producto g d ⁻¹				CV	Valor de p	
	0	5	10	15		Lineal	Cuadra
Mezcla polihierbal*							
Peso final (Kg)	29.8	30.55	31.0	29.1	17.28	0.96	0.81
GDP (Kg)	0.177	0.173	0.186	0.171	23.84	0.96	0.81
CMS (g d ⁻¹)	910.0	854.5	871.3	854.2	18.58	0.37	0.33
EA	0.142	0.138	0.159	0.147	17.94	0.58	0.40
Lisina protegida de la degradación ruminal							
Peso final (Kg)	29.8	28.4	31.3	30.4	19.66	0.73	0.44
GDP (Kg)	0.177	0.170	0.174	0.190	29.27	0.73	0.44
CMS (g d ⁻¹)	910.0	831.9	881.2	956.8	24.90	0.80	0.04
EA	0.142	0.152	0.142	0.144	14.70	0.90	0.70

CV: coeficiente de variación; GDP: ganancia diaria de peso; CMS: consumo de materia seca; EA: Eficiencia alimentaria; Cuadra: cuadrático. Peso inicial fue usado como covariable. *Mezcla elaborada con *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*

Las evaluaciones de proteína en rumiantes en crecimiento a diferentes dosis permiten estimar la eficiencia de su utilización (Nakamura *et al.*, 1994) y se realizan con bajo contenido energético, sin embargo, un estudio realizado con lisina marcada [U-13C] muestra que la incorporación del aminoácido al músculo está en función del consumo

de energía (Savary *et al.*, 2001), lo que pudo limitar la respuesta en este estudio. La misma mezcla herbal mejoró la ganancia de peso en corderas hasta en un 10% (Mejía-Delgadillo *et al.*, 2019), mayor al 5% observado en la respuesta con 10 g en este ensayo, en una dieta con mayor contenido de energía.

Existen pocos estudios en ovinos con aminoácidos protegidos, pero la información de bovinos sugiere que, en animales en crecimiento, la metionina puede ser el principal aminoácido limitante y la lisina el segundo (Hussein y Berger, 1995; Zinn *et al.*, 2007). Información de corderos Awassi en crecimiento sugiere que pueden requerir más metionina en la última etapa de finalización (Abdelrahman *et al.*, 2008). Sin embargo, un estudio con fuentes ricas en lisina sugiere que esto no necesariamente es cierto (Ponnampalam *et al.*, 2005), por lo que es necesario estimar los flujos de lisina y metionina en duodeno para explicar la respuesta de estas evaluaciones.

Una posible causa a la falta de respuesta con ambas fuentes pudo ser que se alteró la relación lisina-metionina, como se ha sugerido en evaluaciones de metionina protegida en ovinos (Raja *et al.*, 2017; Rodríguez-Guerrero *et al.*, 2018). En estimaciones realizadas en experimentos de ovinos en crecimiento con ganancias promedio de 274 g d⁻¹, los flujos de lisina y metionina en el duodeno están en promedio en 10.07 y 2.25 g d⁻¹, respectivamente; los corderos de este experimento, suplementados con la mezcla polih herbal, tuvieron en promedio un flujo de 6.63 g Kg⁻¹ de lisina y 2.87 de metionina, mientras que, para los suplementados con LPR, se estimaron 10.27 y 2.30 g Kg⁻¹ de lisina y metionina, respectivamente.

Otra posibilidad es que la digestibilidad de la lisina en intestino haya sido baja, pero la información de los productos evaluados es escasa. Watanabe *et al.* (2003) estimaron

una digestibilidad intestinal de 49.5% para dicho producto comercial de lisina protegida de la degradación ruminal, estimando que sólo aportaba 28.9% de la lisina metabolizable. Aunque también es posible que la digestibilidad intestinal no haya sido una limitante con base en los datos reportados por Mejía-Delgadillo *et al.* (2019) en corderas en crecimiento, utilizando la misma mezcla polih herbal.

Prado *et al.* (2015) incluyeron otra fuente de LPR (1 g d⁻¹) y no observaron respuesta en la GDP, pero sí una disminución del 8.7% en el consumo, efecto mayor al observado en este estudio con la lisina herbal (5.4%). Por el contrario, Araújo *et al.* (2019) observaron un incremento lineal en el consumo (16.9%), pero su LPR aportaba metionina de sobrepaso con una relación lisina-metionina de 3:1. Se sabe que los aminoácidos pueden estimular la grelina que tiene impactos en el consumo voluntario (Sugino *et al.*, 2010) y que el desbalance puede afectar negativamente el consumo (Harper *et al.*, 1970).

Con relación a los resultados obtenidos del efecto de dichos aditivos sobre el conteo de protozoarios, se observó que la mezcla polih herbal estimuló linealmente la población de Entodinomorfos ($p < 0.10$), pero redujo el número de Holotricos ($p < 0.05$), mientras que la LPR sólo redujo a los Holotricos (lineal, $p < 0.05$; Tabla 2). Se asume que los mecanismos de acción sobre los protozoarios fueron diferentes por las características de los productos (herbal vs sintético).

Tabla 2. Efecto del tipo y dosis diaria de lisina en el contenido de protozoarios ($\times 10^4 \text{ mL}^{-1}$) ruminales de corderos en crecimiento.

Producto	Dosis de producto g d^{-1}				CV	Valor de p	
	0	5	10	15		Lineal	Cuadra
Mezcla polihierbal*							
Entodinidae	6544	6695	8490	8189	48.77	0.06	0.94
Holoreichidae	243	144	167	125	78.55	0.02	0.12
Total	6787	6839	8656	8314	47.54	0.07	0.89
Lisina protegida en rumen							
Entodinidae	6544	7842	6529	6773	44.26	0.90	0.53
Holoreichidae	243	249	135	130	81.09	0.01	0.82
Total	6787	8091	6665	6703	44.06	0.99	0.54

CV: coeficiente de variación; Cuadra: cuadrático. *Mezcla elaborada con *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*

El *Linum usitatissimum* tiene pectinas y mucilago (Saastamoinen y Särkijärvi, 2020) que son fermentados por bacterias y protozoarios, el aceite de la semilla de *Linum usitatissimum* contiene ácidos grasos (omega-3) (Cunnane *et al.*, 1993) y, a diferencia de otras plantas herbales, no tiene altos contenidos de antioxidantes (Szerlauth *et al.*, 2019), pero no está claro qué componente pudo reducir los números de Holotricos. Se sabe que la semilla de *Linum usitatissimum* es usada por ganaderos para tratar diarrea en terneros y otros problemas digestivos, se le han reconocido propiedades anti-inflamatorias, antidiarreicas y espasmolíticas relacionadas con el contenido de polisacáridos mucilaginosos (Mertenat *et al.*, 2020). La otra planta presente en el

producto polihierbal es la leguminosa *Phaseolus mungo*, que ha sido caracterizada como ingrediente proteínico (Sobha y Susan, 2014) pero también tiene propiedades funcionales derivadas de su contenido de oligosacáridos y azúcares (Kavitha *et al.*, 2013); estos últimos estimulan la presencia de protozoarios. Es posible que la reducción en los Holotricos haya sido causada por la quimiotaxis a los azúcares que estimula su migración hacia la fase líquida en el rumen (Diaz *et al.*, 2014), lo que podría explicar la disminución en esa población. El incremento de Entodinos con azúcares ha sido revisado previamente y explica la respuesta de dichos ciliados (Ortega y Mendoza, 2003).

Los efectos de la LPR se pueden explicar por la fracción del producto que se degrada en el rumen. Se considera que los productos ruminalmente protegidos son inertes en el rumen, pero estos tienen una fracción variable que se degrada a nivel ruminal (Lara *et al.*, 2003; Watanabe *et al.*, 2003). Algunos productos comerciales de LPR utilizan sulfato de lisina, grasa hidrogenada, ácido oleico y etilcelulosa, por lo que la liberación parcial de estos compuestos puede tener efectos en el rumen, como los observados en los ciliados. Han *et al.* (1996) reportaron concentraciones más altas de N amoniacal con la inclusión de LPR confirmando que los productos no están completamente protegidos. No se sabe qué compuesto específico de la LPR redujo la cantidad de holotricos.

Los resultados de la bioquímica sanguínea se muestran en la Tabla 3, se puede observar que la mezcla polihierbal no tuvo efectos sobre la mayoría de los parámetros evaluados, con excepción de la deshidrogenasa láctica (DHL, efecto cuadrático $p < 0.05$), mientras que la LPR incrementó la albumina (lineal $p < 0.10$) y la globulina mostró respuesta cuadrática ($p < 0.05$), lo que repercutió en la relación albumina/globulina (lineal,

$p < 0.05$; cuadrático $p < 0.01$). La LPR causó un efecto cuadrático inverso ($p < 0.05$) en bilirrubina y positivo en deshidrogenasa láctica (cuadrático, $p < 0.10$).

Los principales indicadores séricos utilizados para evaluar alteraciones hepáticas incluyen AST, ALT, bilirrubina, proteínas totales y albúmina (Dufour *et al.*, 2000), pero deben evaluarse en forma integral, por lo que los resultados no muestran que las fuentes de lisina hayan afectado la funcionalidad hepática. Los niveles elevados de DHL con la dosis de 5 g d^{-1} de la mezcla polihierbal, podrían ser un indicador de una alta tasa de recambio de síntesis muscular (Beebee y Carty, 1983) y no una respuesta a compuestos presentes en *Linum usitatissimum* como glucósidos cianogénicos (Saastamoinen y Särkijärvi, 2020) que hubieran causado una respuesta lineal en las enzimas hepáticas.

La LPR no causó cambios en los niveles asociados con el metabolismo de las proteínas (proteína total, urea y creatinina) y los cambios en las albúminas o globulinas fueron menores (Tabla 3). Las albúminas son un indicador nutricional indirecto, relacionado con los aminoácidos, y las globulinas dan información del sistema inmune; por lo que los cambios no son indicativos de problemas de salud (Russell, 2007). La bilirrubina total sólo aumentó con 15 g d^{-1} de LPR y la respuesta lineal en fosfatasa alcalina (Tabla 3) sugiere que alguno de los compuestos utilizados para recubrir la lisina puede estar causando estrés hepático.

Tabla 3. Efecto del tipo y dosis diaria de lisina en la bioquímica sanguínea de corderos en crecimiento.

Producto	Dosis de producto g d ⁻¹				CV	Valor de p	
	0	5	10	15		Lineal	Cuadra
Mezcla polihierbal*							
Glucosa (mg dL ⁻¹)	87.1	83.2	92.1	92.3	15.15	0.18	0.77
Urea (mg dL ⁻¹)	31.1	30.4	28.8	34.1	20.90	0.39	0.35
Ac Úrico (mg dL ⁻¹)	0.68	0.60	0.61	0.76	45.17	0.61	0.52
Colesterol (mg dL ⁻¹)	80.4	108.9	81.1	83.8	28.23	0.73	0.24
PT (g dL ⁻¹)	6.6	6.5	6.8	6.6	8.70	0.72	0.40
Albumina (g dL ⁻¹)	3.5	3.3	3.5	3.5	14.45	0.61	0.88
Globulina (g dL ⁻¹)	3.1	3.3	3.2	3.1	13.48	0.98	0.48
Relación A/G	1.12	1.0	1.09	1.06	19.61	0.90	0.84
Bilirrubina (mg dL ⁻¹)	0.48	0.50	0.48	0.44	30.72	0.29	0.31
Creatinina (mg dL ⁻¹)	1.04	1.03	1.09	1.06	14.06	0.40	0.87
ALP (U L ⁻¹)	65.0	65.1	59.7	55.1	33.20	0.33	0.53
DHL (U L ⁻¹)	100.9	124.4	105.4	101.9	28.86	0.46	0.04
AST (U L ⁻¹)	18.3	17.3	13.5	14.3	60.51	0.28	0.61
Calcio (%)	9.4	9.5	9.8	9.3	10.57	0.93	0.47
Fósforo (%)	4.7	4.8	4.5	4.8	12.54	0.65	0.99
Lisina protegida en rumen							
Glucosa (mg dL ⁻¹)	87.1	87.0	88.6	96.0	18.00	0.29	0.67
Urea (mg dL ⁻¹)	31.1	29.4	30.0	30.5	16.26	0.93	0.90
Ac Úrico (mg dL ⁻¹)	0.68	0.84	0.66	0.64	45.04	0.41	0.39
Colesterol (mg dL ⁻¹)	80.4	82.5	99.4	98.8	25.70	0.30	0.70
PT (g dL ⁻¹)	6.6	6.5	6.9	6.6	9.90	0.65	0.32
Albumina (g dL ⁻¹)	3.5	3.4	3.7	3.8	17.19	0.08	0.72
Globulina (g dL ⁻¹)	3.1	3.5	3.3	2.9	15.53	0.17	0.05
Relación A/G	1.12	0.98	0.94	1.44	33.82	0.03	0.01
Bilirrubina (mg dL ⁻¹)	0.48	0.44	0.44	0.58	31.86	0.13	0.05
Creatinina (mg dL ⁻¹)	1.04	1.03	0.89	1.01	16.69	0.56	0.15
ALP (U L ⁻¹)	65.0	72.7	78.6	95.6	32.99	0.05	0.54
DHL (U L ⁻¹)	100.9	128.3	117.4	106.8	28.12	0.28	0.06
AST (U L ⁻¹)	18.3	21.8	15.8	17.0	69.26	0.51	0.99
Calcio (%)	9.4	8.9	9.0	9.5	10.51	0.94	0.31
Fósforo (%)	4.7	4.4	4.5	4.6	11.69	0.80	0.35

CV: coeficiente de variación, PT: proteína total, ALP: fosfatasa alcalina, DHL: deshidrogenasa láctica, AST: aspartato aminotransferasa. *Mezcla elaborada con *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*

El suministro adecuado y equilibrado de lisina y metionina es importante para lograr el máximo potencial de ovinos en crecimiento y existe información que demuestra que la suplementación de proteínas con aminoácidos de sobrepaso particularmente Metionina y Lisina, puede mejorar el consumo, el crecimiento, la eficiencia reproductiva y la producción de leche. Es posible que en raciones con mayor contenido de energía se puedan manifestar los efectos benéficos de los productos utilizados en este estudio.

CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la mezcla polihierbal hecha con *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum*, así como la lisina comercial protegida de la degradación ruminal, no mejoraron el crecimiento de los corderos, pero tuvieron efecto en las poblaciones de protozoos del rumen, presumiblemente por mecanismos de acción diferentes.

REFERENCIAS

- Abdelrahman, M.M. y Hunaiti, D.A. (2008). The effect of dietary yeast and protected methionine on performance and trace minerals status of growing Awassi lambs. *Livestock Science*, 115(2-3): 235-241.
- Araújo, C. M., De Lima M. J. G., Oliveira, K. A., Silva, A. L., and Santos, S. M. T. (2019). Levels of protected lysine and methionine in the diet of lambs: Nutritional parameters and protein metabolites. *Semina:Ciencias Agrarias*, 40:3709-3718. doi:10.5433/1679- 0359.2019v40n6Supl3p3709.
- Ardaillon, P., P. Antant, P. Bourrain, and A. Cartillier. (1989). Compositions for coating feedstuff additives thus coated. United States Patent, US 4,877,621.
- Ardaillon, P. and C. Franzoni. (1992). Enzymatically degradable coating compositions for feed additives intended for ruminants. United States Patent, US 5,098,719.

- Beebee, T.J.C., and Carty, D.S. (1983). A study of lactate dehydrogenase levels and turnover rates during postnatal development in the rat. *BBA - General Subjects*, 757:209-218. doi:10.1016/0304-4165(83)90111-3.
- Cunnane, S.C., Ganguli, S., Menard, C., Liede, A.C., Hamadeh, M.J., Chen, Z.Y., Wolover T.M.S., and Jenkins, DJ. (1993). High α -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *British Journal of Nutrition*, 69:443- 453.
- D'Agosto, M., & Carneiro, M. E. (1999). Evaluation of lugol solution used for counting rumen ciliates. *Revista Brasileira de Zoologia*, 16(3), 725-729.
- Dehority, B.A. (1984). Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. *Applied and Environmental Microbiology*, 48:182-185.
- Diaz, H.L., Karnati, S.K.R., Lyons, M.A., Dehority, B.A., and Firkins, J.L. (2014). Chemotaxis toward carbohydrates and peptides by mixed ruminal protozoa when fed, fasted, or incubated with polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science*, 97:2231-2243. doi:10.3168/jds.2013-7428.
- Dufour, D.R., Lott, J.A., Nolte, F.S., Gretch, D.R., Koff, R.S., and Seeff, L.B. (2000). Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. performance characteristics of laboratory tests. *Clinical Chemistry*, 46:2027-2049. doi:10.1093/clinchem/46.12.2027.
- Flores, A., Mendoza, G., Pinos-Rodriguez, J.M., Plata, F., Vega, S., and Bárcena, R. (2009). Effects of rumen-protected methionine on milk production of dairy goats. *Italian Journal of Animal Science*, 9:271-275.
- Han, I.K., Ha, J.K., Lee, S.S., Ko, Y.G., Lee, H.S. (1996). Effect of supplementing rumenprotected lysine and methionine on ruminal characteristics and nutrient digestibility in sheep. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 9:223-229. doi:10.5713/ajas.1996.223.
- Harper, A.E., Benevenga, N.J., and Wohlhueter, R.M. (1970). Effects of ingestion of disproportionate amounts of amino acids. *Physiological Reviews*, 50:428-558. doi:10.1152/physrev.1970.50.3.428.
- Hussein, H.S., and Berger, L.L. (1995). Feedlot performance and carcass characteristics of Holstein steers as affected by source of dietary protein and level of ruminally

- protected lysine and methionine. *Journal of Animal Science*, 737:3503-3509. doi:10.2527/1995.73123503x.
- Jouany, J. P. (1996). Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *The Journal of nutrition*. 126(4): 1335S-1346S.
- Jouany, J.P. and Morgavi, D.P. (2007). Use of 'natural' products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Animal* 1:1443-1466. doi:10.1017/S1751731107000742.
- Kavitha, B., Hemalatha, G., Kanchana, S., Sundaram, S.P., and Sivasubramaniam, K. (2013). Physicochemical, functional, pasting properties and nutritional composition of selected black gram (*Phaseolus mungo* L.) varieties. *Indian Journal of Science and Technology*, 6:5386-5394.
- Lara, B. A., Martínez, G. D. M., Gama, J. R. B., Palencia, L. L. L., Torres, M. T. S., Bojalil, C. M. G., and Oseguera, J. A. (2003). Degradabilidad ruminal *in situ* e *in vitro* de la metionina protegida. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 41:91-103.
- Lara, A., Mendoza, G.D., Landois, L., Barcena, R., Sánchez-Torres, M.T., Rojo, R., Ayala, J., and Vega, S. (2006). Milk production in Holstein cows supplemented with different levels of ruminally protected methionine. *Livestock Science*, 105:105-108. doi:10.1016/j.livsci.2006.04.032.
- Mendoza-Nazar, P., Mendoza-Martínez, G.D., Herrera-Haro, J., Ruiz-Sesma, B., Bárcena-Gama, R., and Tarango-Arámbula, L. (2012). Effect of ruminally protected methionine on body weight gain and growth of antlers in red deer (*Cervus elaphus*) in the humid tropics. *Tropical animal health and production*, 44:681-687. doi:10.1007/s11250-011-9956-4.
- Mejía-Delgado, M.A., Mendoza, G.D., Lee-Rangel, H.A., Osorio-Terán, A.I., Hernández-García, P.A. (2019) Effect of an herbal lysine source on lamb's growth. *Rev. Acad. Ciênc. Anim.* 2019; 17. 1:199.
- Mertenat, D., Cero, M.D., Vogl, C.R., Ivemeyer, S., Meier, B., Maeschli, A., Hamburger, M., and Walkenhorst, M. (2020). Ethnoveterinary knowledge of farmers in bilingual regions of Switzerland – is there potential to extend veterinary options to reduce antimicrobial use? *Journal of Ethnopharmacology*, 246. doi:10.1016/j.jep.2019.112184.

- Mirman, D. (2014). *Growth Curve Analysis and Visualization Using R*. Chapman & Hall/CRC The R Series. CRC Press. Boca Raton, FL. 170 p.
- Nakamura, T., Klopfenstein, T.J., Gibb, D.J., and Britton, R.A. (1994). Growth efficiency and digestibility of heated protein fed to growing ruminants. *Journal of Animal Science*, 72:774-782. doi:10.2527/1994.723774x.
- NRC. (2007). *Nutrient Requirements of Sheep*. 6th edn. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council, National Academy Press Washington, D.C. USA.
- NRC. (2001). *Nutrient Requirements of dairy cattle*. 7th edn. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council, National Academy Press Washington, D.C. USA.
- Ortega, C.M.E. and Mendoza, M.G.D. (2003). Starch digestion and glucose metabolism in the ruminant: A review. *Interciencia*. 28:380-386.
- Ponnampalam, E.N., Egan, A.R., Sinclair, A.J., and Leury, B.J. (2005). Feed intake, growth, plasma glucose and urea nitrogen concentration, and carcass traits of lambs fed isoenergetic amounts of canola meal, soybean meal, and fishmeal with forage based diet. *Small Ruminant Research*, 58:245-252. doi:10.1016/j.smallrumres.2004.10.007.
- Prado TF, Franca AF, Meirinhos MG, Peron, HJ, Ferreira RN, Oliveira LG y Correa DS. (2015). Animal performance and carcass characteristics from confined lambs fed on concentrate feed and additives. *Anais de Academia Brasileira de Ciencias*. 87:2255 – 2263.
- Raja, A. I.; Abbasi, F.; Abd, M. E.; Abdel-Lafit, M. A.; Soomro, R. N.; Hayat, K.; Mohamed, M. A.; Bodinga, B. M.; Yao, J.; Cao, Y. 2017. Critical analysis of excessive utilization of crude protein in ruminants ration: impact on environmental ecosystem and opportunities of supplementation of limiting amino acids-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(1): 181-190.
- Rodríguez-Guerrero, V., Lizarazo, A. C., Ferraro, S., Suárez, N., Miranda, L. A., and Mendoza, G. D. (2018). Effect of herbal choline and rumen-protected methionine on lamb performance and blood metabolites. *South African Journal of Animal Sciences*, 48:427-434. doi:10.4314/sajas.v48i3.3.

- Russell, K.E., and Roussel, A.J. (2007). Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 23:403-426. doi:10.1016/j.cvfa.2007.07.003.
- Saastamoinen, M., and Särkijärvi, S. (2020). Effect of Linseed (*Linum usitatissimum*) Groats-Based Mixed Feed Supplements on Diet Nutrient Digestibility and Blood Parameters of Horses. *Animals*, 10: 272. doi:10.3390/ani10020272.
- Savary I.C., Hoskin S.O., Dennison N., and Lobley G.E. (2001). Lysine metabolism across the hindquarters of sheep; effect of intake on transfers from plasma and red blood cells. *British Journal of Nutrition*, 85:565-573. doi:10.1079/BJN2000318.
- Smolin, L. A., & Grosvenor, M. B. (2012). *Nutrition: Science and applications*. 3rd Ed. John Wiley & Sons.
- Sobha, K., and Susan, T.A. (2014). Evaluation of amino acid composition of *Phaseolus mungo* (black gram) and *Labeo rohita* (rohu) in the perspective of human dietary requirements. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 5:542- 549.
- Socha, M. T., D. E. Putnam, B. D. Garthwaite, N. L. Whitehouse, N. A. Kierstead, C. G. Schwab, G. A. Ducharme, and J. C. Robert (2005). Improving intestinal amino acid supply of pre- and postpartum dairy cows with rumen-protected methionine and lysine. *J. Dairy Sci.* 88:1113-1126.
- Sugino, T., Kawakita, Y., Fukumori, R., Hasegawa, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Obitsu T., and Taniguchi, K. (2010). Effects of glucose and amino acids on ghrelin secretion in sheep. *Animal science journal*, 81:199-204. doi:10.1111/j.1740-0929.2009.00733.x.
- Swanepoel N. (2009). Estimating amino acid limitations in California dairy rations and the effect of feeding a ruminally protected lysine supplement on animal performance. Tesis Doctoral. University of Pretoria.
- Szerlauth A., Muráth S., Viski S., and Szilagyí I. (2019). Radical scavenging activity of plant extracts from improved processing. *Heliyon*, 5:e02763. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02763.

- Vyas, D., and Erdman, R.A. (2009). Meta-analysis of milk protein yield responses to lysine and methionine supplementation. *Journal of Dairy Science*, 92:5011-5018. doi:10.3168/jds.2008-1769.
- Watanabe, K., Sato, H., Kobayashi, T., Katoh, K., and Obara, Y. (2003). Determination of intestinal disappearance of lysine and methionine derived from ruminally protected lysine and methionine in Holstein heifers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16:549- 554. doi:10.5713/ajas.2003.549.
- Zinn, R.A., Calderón, J.F., Corona, L., Plascencia, A., Montañó, M.F., and Torrentera, N. (2007). Phase feeding strategies to meet metabolizable amino acid requirements of calf-fed holstein steers. *Professional Animal Scientist*, 23:333-339. doi:10.15232/S1080- 7446(15)30986-4

CAPÍTULO 3

COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y METABÓLICO DE OVINOS ALIMENTADOS CON DIFERENTES FUENTES Y DOSIS DE METIONINA PROTEGIDA

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar niveles de un aditivo herbal (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*, MH, OptiMethionine® de Nuproxa México, Indian Herbs) con una fuente de metionina sintética protegida en rumen (MS, Mepron®) en el comportamiento productivo y metabólico de corderos en crecimiento. Se utilizaron 56 corderos Pelibuey x East Friesian de aproximadamente dos meses de edad, asignados aleatoriamente a siete tratamientos: grupo control, o tres dosis diarias de dos fuentes de metionina: MH (2.1, 2.7 y 3.8 g animal⁻¹) y MS (2.1, 2.7 y 3.8 g animal⁻¹) dosificados diariamente por vía oral durante 45 días. Se les complementaba con 10 g por animal día⁻¹ de lisina sintética, para mantener la relación lisina/metionina (4.5, 3.5 y 2.5/1, respectivamente). Los corderos fueron alimentados individualmente con una ración basal (13.95% PC, 2.32 Mcal EM KgMS⁻¹). Los niveles de ambas fuentes mejoraron linealmente la respuesta productiva de los animales (peso final, ganancia total, ganancia diaria de peso, conversión alimenticia y eficiencia alimentaria) respecto al control ($p \leq 0.05$) conforme se incrementó la dosis, sin presentar diferencias entre las diferentes fuentes de metionina, con excepción del consumo de materia seca. En los valores de la bioquímica sanguínea, la mezcla herbal disminuyó linealmente la aspartato aminotransferasa y los niveles de fósforo ($p < 0.05$) conforme se aumentó el nivel de inclusión del aditivo, mientras que la MS aumentó los niveles de colesterol en sangre

(efecto cuadrático, $p < 0.05$). Los resultados indican que, tanto la mezcla herbal (OptiMethionine[®]) como la MS, mejoran el crecimiento de corderos post-destete.

INTRODUCCIÓN

Se conoce que la adquisición de fuentes de proteína representa una proporción importante de los costos de alimentación en cualquier sistema productivo. La utilización de concentrados proteicos incrementa los costos de producción y aumenta los riesgos y dependencias del sistema (Rodríguez *et al.*, 2007). Suplementar las dietas de rumiantes con proteína no degradable en rumen, puede incrementar el flujo de nitrógeno y aminoácidos al intestino delgado, lo que resulta en una mejora de la eficiencia de la utilización del nitrógeno y un mayor crecimiento (El-Tahawy y Ismaeil, 2013). El perfil de aminoácidos que llega al intestino es tan importante como la cantidad de proteína para poder mejorar el comportamiento productivo del animal. Por lo tanto, cuando la proteína metabolizable tiene un adecuado perfil de aminoácidos esenciales, el contenido de proteína cruda del alimento puede reducirse, junto con la excreción de urea y otros compuestos nitrogenados, optimizando el uso de la proteína metabolizable y maximizando el comportamiento productivo del animal (Araújo *et al.*, 2019).

Existen pocos estudios en ovinos con aminoácidos protegidos, pero la información de bovinos sugiere que, en animales en crecimiento, la metionina puede ser el principal aminoácido limitante y la lisina el segundo (Araújo *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019; Zinn *et al.*, 2007) por su baja concentración en los alimentos utilizados en la alimentación animal, por lo que deben ser proveídos, con la intención de cubrir los requerimientos nutricionales de los animales (Li *et al.*, 2019; El-Tahawy y Ismaeil, 2013). La mayor

eficiencia en el uso de la proteína metabolizable, cuando la dieta esta balanceada en la cantidad de lisina y metionina, reduce la excreción de nitrógeno y, consecuentemente, reduce el gasto energético involucrado en este proceso (Araújo *et al.*, 2019b). Sin embargo, su inclusión en forma libre no es efectiva ya que son rápidamente degradados en por los microorganismos ruminales, haciendo difícil el cumplimiento de los requerimientos nutricionales del animal (Araújo *et al.*, 2019b; Li *et al.*, 2019). Específicamente la mayor disponibilidad de la metionina tiene un efecto positivo en el metabolismo hepático del animal, como reducir la incidencia del hígado graso en las vacas lecheras, ya que es un componente de la lipoproteína de baja densidad (VLDL) (Schwab *et al.*, 2007). Además, la metionina juega un papel importante en la síntesis de proteína y funciones como donador de metilos y precursor de una gran cantidad de procesos biológicos (Li *et al.*, 2019). Estudios previos muestran que la metionina protegida de la degradación ruminal incrementa la producción de leche en bovinos durante la lactancia temprana (Ayala *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2016), mejora el comportamiento productivo en animales en crecimiento (El-Tahawy y Ismaeil, 2013) y mejora la respuesta inflamatoria y antioxidante en bovinos productores de leche (Osorio *et al.*, 2013), sin embargo, la investigación en pequeños rumiantes es limitada comparada con la desarrollada en ganado bovino.

Por otro lado, es importante mencionar que durante la última década se ha fomentado el uso de aditivos de origen natural en la nutrición animal y humana. Para obtener efectos benéficos de las hierbas y especias, se pueden agregar al alimento como plantas secas o partes de plantas y como extractos. En este aspecto, las hierbas y especias no son sólo estimulantes del apetito y la digestión, sino que pueden, tener impacto en otras

funciones fisiológicas, ayudar a mantener la buena salud y el bienestar de los animales y mejorar su rendimiento (Frankic *et al.*, 2009). Los estudios actuales muestran resultados prometedores con respecto al uso de fitoquímicos como promotores de crecimiento y producción (Frankic *et al.*, 2009; Mendoza *et al.*, 2018). Sin embargo, es necesario evaluar la dosis adecuada bajo condiciones específicas como son la especie animal, el fin zootécnico y la etapa productiva. Por lo que el objetivo del presente estudio fue comparar una mezcla herbal (hecha a base de *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*) y una fuente de metionina sintética protegida de la degradación ruminal sobre los parámetros sanguíneos y el comportamiento productivo de corderos en crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de campo del presente estudio se llevó a cabo en instalaciones pertenecientes al Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la FMVZ-UNAM. Sus coordenadas geográficas son 19°20'88"N y 99°15'25"O y se encuentra a una altura de 2670 msnm. El clima de la región es Cw(b) que corresponde a semifrío subhúmedo con lluvias en verano, con una precipitación pluvial de 800 a 1200 mm anuales y una temperatura promedio de 19°C (García, 1988). Se utilizaron 56 corderos cruza East Friesian x Pelibuey, de aproximadamente 2 meses de edad, alojados en jaulas individuales, distribuidos de manera aleatoria en 7 tratamientos (en los cuales se modificaron las dosis y fuentes de metionina en cada tratamiento): grupo control o tres dosis diarias de dos fuentes de metionina: Metionina herbal (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*, MH, OptiMethionine®) (2.1, 2.7 y 3.8

g animal⁻¹) y Metionina sintética (MS, Mepron[®]) (2.1, 2.7 y 3.8 g animal⁻¹), dosificados diariamente por vía oral durante 45 días.

OptiMethionine[®], correspondiente a la mezcla herbal, fue provista por Nuproxa Mexico (Indian Herbs y Nuproxa Switzerland). Estos aditivos herbales para alimentación son productos estandarizados y tienen mezclas certificadas, siguiendo las normas ISO 9001 y GMP (*Good Manufacturing Practices*).

Durante los 45 días de prueba a los 56 corderos se les alimento *ad libitum*, con una dieta que contenía: 50 % de Rastrojo de maíz, 40 % de Maíz amarillo quebrado, 2.5 % de urea, 5.5 % de melaza y 2% de Vitasal[®] PMZ mineral, específica para ovinos, la cual cubría aproximadamente 12.95 % de PC y 2.32 Mcal EM KgMS⁻¹. La dieta se elaboró de acuerdo con los requerimientos nutricionales para ovinos en engorda de 30 Kg de peso vivo promedio con una ganancia diaria de peso de 200 g, establecidos por el *National Research Council* (NRC, 2007). Se les complementaba con 10 g por animal día⁻¹ de lisina sintética para mantener la relación lisina/metionina (4.5, 3.5 y 2.5:1, respectivamente). Cada animal tenía acceso a agua y alimento limpios, que se les cambiaban diariamente. Para asegurar el consumo exacto de la metionina, tanto herbal como sintética, se administraron diariamente en forma individual los diferentes productos y dosis de los tratamientos, utilizando como vehículo una mezcla previamente elaborada con 750 g de harina de maíz, 50 g de melaza y 100 mL de agua (56 dosis), estas se humectaban con melaza diluida, previo a la administración, para una mejor aceptación por parte del animal. Se realizó un periodo de adaptación tanto a la dieta como a las instalaciones y al consumo del producto, 15 días antes de la prueba.

El alimento se les proporcionó *ad libitum*, diariamente en dos horarios (8:30 y 12:00 horas), pesándolo justo antes de ser ofrecido con una báscula digital con capacidad para 1 g – 5 Kg. El alimento rechazado se les retiraba al día siguiente a las 8:00 horas, antes de ofrecer la siguiente ración, y de igual manera se pesaba con la báscula digital. Se tomaron muestras del alimento ofrecido y rechazado cada vez que se realizaba una mezcla nueva, las cuales se deshidrataron en estufa de aire forzado a 55°C durante 24 horas, para determinar su porcentaje de humedad y materia seca de acuerdo con los métodos establecidos por la A.O.A.C (2007). El consumo de materia seca se estimó por diferencia entre la materia seca ofrecida, menos la materia seca rechazada. Los animales se pesaron al inicio y al final del experimento en una báscula digital, con capacidad de 500 Kg. La ganancia de peso total se calculó a través de la diferencia entre el peso final y el peso inicial. La ganancia de peso total dividida entre los 45 días de prueba permitió obtener la ganancia diaria de peso. La conversión alimenticia se obtuvo al dividir el consumo diario en base húmeda, entre la ganancia diaria de peso de cada animal.

Al término del periodo de prueba se colectaron aproximadamente 5 mL de sangre de cada cordero mediante venopunción yugular. Estas muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para separar el suero, mismo que se extrajo con una micropipeta de precisión y se colocó en un tubo de ensaye nuevo, previamente identificado, con capacidad para 5 mL. El suero se congeló a 5°C para su posterior análisis de laboratorio. Se realizaron las pruebas de biometría hemática mediante la técnica de fotometría automatizada en el laboratorio de análisis clínicos veterinarios (LACLIVET).

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con ocho repeticiones por tratamiento. Los datos fueron analizados mediante contrastes ortogonales con 5% de nivel de significancia utilizando el software estadístico JMP; los contrastes evaluaron los efectos del grupo control (Ctrl) *versus* los animales complementados con metionina herbal (MH) y los complementados con metionina sintética (MS), así como los efectos de MH vs MS. Para probar los efectos lineales y cuadráticos del nivel de metionina, los datos también fueron analizados por medio de polinomios no ortogonales con el software estadístico JMP. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observa un incremento lineal ($p < 0.05$) en las principales variables productivas, peso final (Kg), ganancia total (Kg), GDP (g), conversión alimenticia y eficiencia alimentaria, conforme se incrementó la dosis de metionina herbal, resultando un aumento en la ganancia de peso total de hasta 2.5 Kg animal⁻¹ con la dosis más alta de suplementación, respecto al grupo control. Se observó un incremento muy similar ($p < 0.05$) al realizar la suplementación con el producto sintético (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del tipo y dosis diaria de metionina en el comportamiento productivo de corderos en crecimiento.

Producto	Dosis de producto g d ⁻¹				CV	Valor de p	
	0	2.1	2.7	3.8		Lineal	Cuadra
Metionina herbal*							
Peso final (Kg)	26.1	26.2	27.9	28.6	11.01	0.02	0.37
GT (Kg)	5.9	6.2	7.2	7.7	21.02	0.02	0.35
GDP (g)	0.130	0.137	0.159	0.172	21.02	0.02	0.36
CMS (g d ⁻¹)	831	798	848	892	10.99	0.26	0.13
CA	6.6	5.9	5.5	5.2	17.42	0.01	0.98
EA	0.158	0.171	0.187	0.192	15.95	0.01	0.85
Metionina sintética							
Peso final (Kg)	26.1	29.0	29.2	28.1	9.10	0.01	0.26
GT (Kg)	5.9	7.5	7.8	7.6	18.16	0.01	0.26
GDP (g)	0.130	0.168	0.174	0.170	18.16	0.02	0.27
CMS (g d ⁻¹)	831	917	930	879	10.70	0.17	0.20
CA	6.6	5.5	5.4	5.2	16.51	0.01	0.29
EA	0.158	0.182	0.189	0.192	14.31	0.01	0.48

CV: coeficiente de variación; GT: ganancia total; GDP: ganancia diaria de peso; CMS: consumo de materia seca; CA: conversión alimenticia; EA: Eficiencia alimentaria; Cuadra: cuadrático. *Mezcla elaborada con *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*

La mejora en los parámetros productivos al suplementar corderos en crecimiento con aminoácidos protegidos también es reportada por El-Tahawy e Ismaeil (2013), que observaron en corderos un aumento en el peso final de hasta 2.15 Kg animal⁻¹, al

suplementar con 3.3 g de metionina/Kg de concentrado sobre los animales no suplementados (21.86 Kg vs 19.71 Kg, respectivamente). Esta respuesta podría explicarse ya que, de acuerdo con estudios previos (Lorenzana *et al.*, 2020), estos productos herbales, al igual que la MS contienen proteína no degradable en rumen que puede aumentar el flujo de proteína y aminoácidos al tracto gastrointestinal posterior y, por lo tanto, aumentar el suministro de proteína metabolizable en la dieta de rumiantes jóvenes (Coomer *et al.*, 1993; De Almeida *et al.*, 2016). Además, cuando la proteína metabolizable es de alta calidad (con el perfil de aminoácidos esenciales apropiado), se optimiza la eficiencia del uso de proteína metabolizable y se reduce la excreción de urea y otros compuestos nitrogenados (menor gasto energético), lo que puede provocar la mejora en el comportamiento productivo del animal (Alves, 2004; De Almeida *et al.*, 2016; Detmann *et al.*, 2014). Otro aspecto para considerar es la etapa productiva en la que se ofrece esta suplementación, en este sentido, Abdelrahman *et al.* (2008) mencionan que corderos Awassi en crecimiento, pueden requerir más metionina en la última etapa de finalización, lo que puede estar relacionado con la respuesta de la presente investigación ya que los aditivos fueron ofrecidos en los últimos 45 días de engorda de los corderos.

Contrario a lo que se observó en el presente estudio, Araújo *et al.* (2019) reportan una respuesta lineal positiva en el consumo de materia seca al aumentar los niveles de suplementación de lisina y metionina protegidas de la degradación ruminal (relación 3:1) en corderos de aproximadamente 8 meses de edad; dichos autores asocian este aumento con el equilibrio entre las fuentes de proteína degradable en rumen y la no degradable, lo que incrementa la síntesis de proteína microbiana, sin embargo, ellos

utilizaron pasta de soya, maíz, ensilaje y urea como fuentes de proteína degradable en rumen, mientras que en el presente estudio se utilizó una dieta basada en rastrojo de maíz, maíz y urea, lo que pudo estar relacionado con dicha diferencia.

Al realizar la comparación entre las diferentes fuentes de suplementación, no se observaron diferencias en la mayoría de las variables de respuesta entre el producto herbal y sintético (Tabla 2), lo que implica que tienen un comportamiento productivo similar los animales suplementados con uno u otro producto, excepto para la variable consumo de MS que fue mayor ($p < 0.05$) para el producto sintético. Sin embargo, al comparar ambos tratamientos de suplementación con el grupo control, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para prácticamente todas las variables productivas, excepto consumo de MS, siendo mayor tanto para el producto herbal como para el producto sintético.

De acuerdo con Raja *et al.* (2017), la relación lisina:metionina (Lis:Met) sugerida para mejorar los parámetros productivos y reproductivos de bovinos lecheros es 3:1, lo cual es similar a lo reportado en esta investigación, ya que se obtuvo el mejor comportamiento productivo en los corderos con la relación 2.5:1. A diferencia de otras investigaciones en donde no se obtuvo mejora en la respuesta productiva en ovinos (Lorenzana *et al.*, 2020b; Rodríguez *et al.*, 2018), en donde mencionan que una posible causa pudo ser que se alteró la relación Lis:Met.

Tabla 2. Efecto de la fuente de metionina en el comportamiento productivo de corderos en crecimiento.

	Ctrl	MH	MS	CV	Contrastes (<i>valor de p</i>)			
					Ctrl vs	Ctrl vs	Ctrl vs	MH vs
					MH+MS	MH	MS	MS
PF (Kg)	26.1	27.6	28.8	10.13	0.02	0.05	0.01	0.14
GT (Kg)	5.9	7.0	7.7	18.68	0.02	0.05	0.01	0.15
GDP (Kg)	0.130	0.156	0.170	18.68	0.02	0.05	0.01	0.15
CMS (g)	831	846	909	10.93	0.28	0.82	0.09	0.05
CA	6.6	5.5	5.4	15.24	0.01	0.01	0.01	0.46
EA	0.158	0.183	0.188	13.64	0.02	0.03	0.02	0.54

Ctrl: control; MH: metionina herbal; MS: metionina sintética; CV: coeficiente de variación; PF: peso final; GT: ganancia total; GDP: ganancia diaria de peso; CMS: consumo de materia seca; CA: conversión alimenticia; EA: eficiencia alimentaria.

A pesar del bajo contenido de aminoácidos de la MH, con relación a la MS, este producto se ha usado en dietas para aves, para sustituir uno a uno la metionina sintética (Hashemi *et al.*, 2011). Se asume que en estos productos herbales, la metionina se encuentra en forma de dipéptidos y oligopéptidos que facilitan la formación de S-adenosil metionina (Halder y Roy, 2007). Asimismo, evaluaciones de productos herbales de plantas con metionina, como la leguminosa *T. foenum-graecum*, indican que estos productos tienen diversos metabolitos, entre ellos glutatión, β -carotenos y α -tocoferol que les confieren propiedades antioxidantes (Mukthamba *et al.*, 2016; Wani y Kumar, 2018). Mientras que *A. sativum* es una fuente rica de aceites esenciales y compuestos organosulfurados (como la alicina), los cuales pueden tener actividad

antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatoria y antiparasitaria (Abad, 2017), por lo que se puede especular que estos productos herbales tienen propiedades nutraceuticas (Mendoza *et al*, 2018).

Al obtener los resultados del comportamiento metabólico de los corderos en crecimiento, se puede observar que todos los valores están dentro de los parámetros de referencia adecuados para dicha especie (Tabla 3). Se presentó una disminución lineal ($p = 0.02$) en la concentración de la enzima hepática aspartato aminotransferasa (AST) al aumentar la dosis de suplementación del producto herbal, asimismo, la concentración de fósforo en sangre presentó un efecto cuadrático ($p = 0.02$), registrando la concentración más elevada al utilizar la suplementación media de ambas fuentes de metionina.

Al comparar las diferentes fuentes de suplementación se observó diferencia en la enzima AST entre el grupo suplementado con el producto herbal contra el grupo control, siendo menor la concentración en sangre para el grupo con la suplementación (Tabla 3), mientras que la concentración de fósforo fue menor en el grupo control con relación a los dos grupos suplementados, tanto con el producto herbal, como con el producto sintético. La enzima AST está directamente ligada al estado hepático y se utiliza como indicador de daño (Duncan y Prasse, 1982), sin embargo, a pesar de encontrar esta diferencia entre el grupo suplementado con el producto herbal y el grupo control, ambos parámetros se encuentran dentro del rango normal de la especie, además es importante considerar algunos otros indicadores como ALT, bilirrubina y proteínas totales, para evaluar alteraciones hepáticas, los cuales no presentaron

diferencias entre tratamientos, por lo que los resultados no muestran que las fuentes de lisina hayan afectado la funcionalidad hepática.

Tabla 3. Comportamiento metabólico de corderos en crecimiento utilizando diferentes fuentes de metionina protegida.

Metabolito	Ctrl	MH	MS	CV	Contrastes (<i>valor de p</i>)			
					Ctrl vs	Ctrl vs	Ctrl vs	MH vs
					MH+MS	MH	MS	MS
Glucosa (mg dL ⁻¹)	82.8	77.8	76.0	15.06	0.41	0.51	0.38	0.73
Urea (mg dL ⁻¹)	30.4	26.5	27.5	19.22	0.11	0.09	0.19	0.46
Ac Úrico (mg dL ⁻¹)	0.71	0.81	0.85	27.43	0.23	0.32	0.21	0.65
Colesterol (mg dL ⁻¹)	47.5	47.7	49.5	15.20	0.67	0.93	0.49	0.40
PT (g dL ⁻¹)	6.3	6.6	6.6	18.02	0.43	0.41	0.51	0.81
Albumina (g dL ⁻¹)	3.4	3.6	3.6	17.04	0.34	0.35	0.39	0.92
Globulina (g dL ⁻¹)	2.9	3.0	2.9	22.08	0.70	0.59	0.85	0.62
Relación A/G	1.2	1.3	1.3	17.67	0.19	0.22	0.20	0.90
Bilirrubina (mg dL ⁻¹)	0.35	0.32	0.36	37.83	0.76	0.46	0.86	0.22
Creatinina (mg dL ⁻¹)	0.84	0.80	0.81	22.27	0.39	0.35	0.50	0.70
ALP (U L ⁻¹)	33.5	36.0	38.2	28.75	0.42	0.61	0.32	0.46
DHL (U L ⁻¹)	89.0	97.6	96.5	19.79	0.32	0.35	0.35	0.97
AST (U L ⁻¹)	81.4	68.8	72.7	20.74	0.04	0.03	0.08	0.37
Calcio (%)	9.0	9.4	9.6	8.11	0.19	0.34	0.14	0.36
Fósforo (%)	4.1	4.6	4.6	9.13	0.003	0.01	0.01	0.91

Ctrl: control; MH: metionina herbal; MS: metionina sintética; CV: Coeficiente de variación; PT: proteína total; ALP: fosfatasa alcalina, DHL: deshidrogenasa láctica, AST: aspartato aminotransferasa.

No hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las variables metabólicas entre el grupo suplementado con el producto herbal y el suplementado con el producto sintético, por lo que se confirma que la respuesta metabólica por parte del animal es similar con ambos productos bajo las condiciones desarrolladas en la presente investigación.

CONCLUSIÓN

Los resultados indican que la suplementación con la mezcla polihierbal hecha con *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa* (OptiMethionine®), así como la metionina sintética comercial protegida de la degradación ruminal, mejoraron los parámetros productivos de corderos en crecimiento comparados con animales no suplementados, obteniendo la mayor respuesta al suministrar la dosis más alta de suplementación (3.8g d⁻¹). Lo que implica que estos productos pueden ser utilizados como aditivos en la alimentación de corderos con la intención de mejorar la productividad animal.

REFERENCIAS

- A.O.A.C. 2007. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis. 17th ed. Washington. D.C. USA.
- Abad, P.C. (2017). Evaluación de la incorporación en la dieta animal (ingesta y metabolización) del propil propano tiosulfonato como aditivo natural derivado de alíáceas. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España
- Abdelrahman, M.M. y Hunaiti, D.A. (2008). The effect of dietary yeast and protected methionine on performance and trace minerals status of growing Awassi lambs. *Livestock Science*, 115(2-3): 235-241.

- Alves, D. (2004). Nutrição aminoacídica de bovinos. *Current Agricultural Science and Technology*, 10(3).
- Araújo, C., Macedo, J., Oliveira, K., Silva, A., & Siqueira, M. (2019). Levels of protected lysine and methionine in the diet of lambs: nutritional parameters and protein metabolites. *Semina: Ciências Agrárias*. 40(6,3), 3709-3718. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n6Supl3p3709.
- Araújo, C., Macedo, J., Oliveira, K., Varanis, L., Assis, T., & Siqueira, M. (2019b). Effect of the inclusion of lysine and methionine on the nutritional performance and ingestive behavior of lambs. *Semina: Ciências Agrárias*. 40(2), 957-970. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n2p957.
- Ayala, J., Mendoza, G. D., Pinos-Rodriguez, J. M., Lara, A., & Sanchez, M. T. (2010). Effects of fat and rumen-protected methionine supplementation on production response of first-lactation cows. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 60: 3, 159-165. DOI: 10.1080/09064702.2010.511254.
- Coomer, J. C.; Amos, H. E.; Froestschel, M. A.; Ragland, K. K.; Williams, C. C. 1993. Effects of supplemental protein source on ruminal fermentation, protein degradation and amino acid absorption in steers and on grow and feed efficiency in steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 71(11): 3078-3086.
- De Almeida, L. M.; Detmann, E.; Gomes, D. I.; Reis, W. L.; Batista, E. D.; Campos, V. S.; Paulino, M. F. 2016. Intake, digestibility and nitrogen utilization in cattle fed tropical forage and supplemented with protein in the rumen, abomasum, or both. *J. Anim. Sci. Biotech.* 7(1): 11.
- Detmann E., Valente E.E.L., Batista E.D., Huhtanen P. (2014). An evaluation of the performance and efficiency of nitrogen utilization in cattle fed tropical grass pastures with supplementation. *Liv Sci.* 2014; 162:141-53. doi:10.1016/j.livsci.2014.01.029.7
- El-Tahawy, A., & Ismaeil, A. (2013). Methionine-supplemented diet increases the general performance and value of Rahmani lambs. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 3(3), 513-520.
- Frankič, T., Voljč, M., Salobir, J., & Rezar, V. (2009). Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition. *Acta Agriculturae Slovenica*. 94(2), 95-102.

- García E. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köpen. (Para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Instituto de Geografía, México DF: UNAM, 1988.
- Halder, G., & Roy, B. (2007). Effect of herbal or synthetic methionine on performance, cost benefit ratio, meat and feather quality of broiler chicken. *International Journal of Agricultural Research*, 2(12), 987-996.
- Hashemi, S. R., & Davoodi, H. (2011). Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary research communications*, 35(3), 169-180.
- Li, H., Jiang, B., & Zhou, Y. (2019). Effects of supplementation of rumen-protected methionine on performance, nitrogen balance, carcass characteristics and meat quality of lambs fed diets containing buckwheat straw. *Canadian Journal of Animal Science*. <https://doi.org/10.1139/CJAS-2018-0180>.
- Lorenzana M.A., De la Torre H.M., Lizarazo C.A., Plata P.F., Miranda R.L., Martínez G.A. & Mendoza M.G. 2020. Ruminal ammonia concentration and fermentation kinetics of commercial herbal feed additives with amino acids. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*. En línea.
- Lorenzana M.A., Lizarazo C.A., De la Torre H.M., Plata P.F. & Mendoza M.G. 2020b. Comparison of a Polyherbal Mixture with a Rumen-Protected Lysine on Lamb Growth, Protozoan Count and Blood Chemistry. *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 04:32 – 39. DOI: 10.5281/zenodo.3986575
- Mendoza, G. D., Oviedo, M. F., Pinos, J. M., Lee-Rangel, H. A., Vázquez, A., Flores, R., Pérez, F., Roque, A., Cifuentes, O. 2018. Milk production in dairy cows supplemented with herbalcholine and methionine. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, 52(1), 332-343.
- Mukthamba, P.; Srinivasan, K. 2016. Hypolipidemic and antioxidant effects of dietary fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds and garlic (*Allium sativum*) in high-fat fed rats. *Food Biosci.* 14: 1-9.
- NRC. (2007). *Nutrient Requirements of Sheep*. 6th edn. Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture and Natural Resources, National Research Council, National Academy Press Washington, D.C. USA.

- Osorio, J. S., Ji, P., Drackley, J. K., Luchini, D., & Loor, J. J. (2013). Supplemental Smartamine M or MetaSmart during the transition period benefits postpartal cow performance and blood neutrophil function. *Journal of Dairy Science*. 96(10), 6248-6263. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2012-5790>.
- Raja, A. I.; Abbasi, F.; Abd, M. E.; Abdel-Lafit, M. A.; Soomro, R. N.; Hayat, K.; Mohamed, M. A.; Bodinga, B. M.; Yao, J.; Cao, Y. (2017). Critical analysis of excessive utilization of crude protein in ruminants ration: impact on environmental ecosystem and opportunities of supplementation of limiting amino acids-a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(1): 181-190.
- Rodríguez-Guerrero, V., Lizarazo, A. C., Ferraro, S., Suárez, N., Miranda, L. A., and Mendoza, G. D. (2018). Effect of herbal choline and rumen-protected methionine on lamb performance and blood metabolites. *South African Journal of Animal Sciences*, 48:427-434. doi:10.4314/sajas.v48i3.3.
- Rodríguez, R., Sosa, A., & Rodríguez, Y. (2007). Microbial protein synthesis in rumen and its importance to ruminants. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 41(4), 287-294.
- Schwab, C. G., Boucher, S. E., & Sloan, B. K. (2007). Metabolizable protein and amino acid nutrition of the cow: Where are we in 2007. In *Proceedings of the 68th annual Minnesota nutrition conference* (pp. 121-138).
- Wani, S. A.; Kumar, P. (2018). Fenugreek: A review on its nutraceutical properties and utilization in various food products. *J. Saudi Society Agric Sci.* 17(2): 97-106.
- Zhou, Z., Vailati-Riboni, M., Trevisi, E., Drackley, J. K., Luchini, D. N., & Loor, J. J. (2016). Better postpartal performance in dairy cows supplemented with rumen-protected methionine compared with choline during the periparturient period. *Journal of Dairy Science*. 99(11), 8716-8732.
- Zinn, R.A., Calderón, J.F., Corona, L., Plascencia, A., Montañón, M.F., and Torrentera, N. (2007). Phase feeding strategies to meet metabolizable amino acid requirements of calf-fed holstein steers. *Professional Animal Scientist*, 23:333-339. doi:10.15232/S1080-7446(15)30986-4

CAPÍTULO 4

CAMBIOS EN LA MICROBIOTA RUMINAL DE CORDEROS SUPLEMENTADOS CON DIFERENTES DOSIS DE METIONINA HERBAL PROTEGIDA DE LA DEGRADACIÓN RUMINAL

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar los cambios en la composición y estructura de las comunidades bacterianas ruminales de corderos en crecimiento, como respuesta al uso de diferentes niveles de un aditivo herbal (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*, OptiMethionine® de Nuproxa México, Indian Herbs). Se realizó la cuantificación de *Prevotella* spp. y *Ruminococcus* spp., géneros bacterianos importantes en la composición de la comunidad microbiana ruminal, a través de PCR tiempo real (qPCR), para lo cual se utilizaron mezclas de ADN bacteriano obtenido de líquido ruminal filtrado, de los corderos alimentados con OptiMethionine®; las muestras se agruparon en función de la dosis del producto herbal administrado (0, 2.1, 2.7 y 3.8 g por animal día⁻¹) para evaluar los cambios cuantitativos en dichos grupos bacterianos. Además, se analizaron por secuenciación masiva en la plataforma Illumina® MiSeq™, 24 muestras de ADN metagenómico correspondientes a 8 repeticiones de tres tratamientos: control (C), la dosis media del aditivo herbal (Hm, 2.7 g por animal día⁻¹) y la dosis alta (Ha, 3.8 g por animal día⁻¹); se obtuvieron un total de 1,012,826 secuencias, en un rango de 32,914 a 53,866, correspondientes a las muestras Ha5 y Ha4, respectivamente. Después del proceso de filtrado, el número resultante de secuencias fue de 406,481, en un rango

de 22,429 a 12,547, correspondientes a las muestras Hm12 y Ha5, respectivamente; el número menor de secuencias se utilizó para normalizar los datos y calcular los índices de diversidad, así como los porcentajes de abundancia relativa de las Familias bacterianas presentes en el rumen de los animales tratados. El número de secuencias únicas fue de 6,541. Se observó poca uniformidad en las muestras (índice de Shannon alto), tanto control como tratadas con el aditivo herbal; también se observó un alto grado de dominancia en estas muestras (índice Simpson cercano a 1). Se observó un efecto cuadrático en Familias bacterianas que presentaron abundancias relativas mayores al 1%, como *Prevotellaceae* y *Christensenellaceae* al aumentar la dosis del aditivo herbal.

INTRODUCCIÓN

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica que alberga diversos microorganismos como bacterias y protozoos principalmente, aunque llega a contener levaduras, hongos y hasta virus. Se sabe que existe una respuesta dinámica de esta compleja red de microorganismos a la cantidad y composición química de la dieta. Las bacterias juegan un papel clave en la fermentación ruminal, lo que a su vez tiene un gran impacto en la producción y la salud de los animales, sin embargo, la mayoría de las investigaciones que describen estas interacciones se han desarrollado en bovinos productores de leche (De Nardi *et al.*, 2016; Derakhshani *et al.*, 2017), no en ovinos. La mezcla herbal elaborada con *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativum* aporta diferentes metabolitos secundarios que pueden conferir protección contra su degradación en el rumen (Lorenzana *et al.*, 2020), así como una serie de fitoquímicos

con actividades insecticidas, antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes que podrían afectar a la microbiota ruminal (Mendoza *et al.*, 2019). Por lo anterior, el objetivo del presente experimento fue evaluar los efectos de la mezcla herbal con *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativum*) sobre los cambios en la composición y estructura de la microbiota ruminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de líquido ruminal de corderos alimentados durante 60 días con el aditivo herbal OptiMethionine® (0, 2.1, 2.7 y 3.8 g por animal día⁻¹), al final del periodo de engorda, mediante una sonda esofágica. Una vez colectadas las muestras de líquido ruminal, se filtraron por 8 capas de gasa y se almacenaron en ultracongelador (-80°C) hasta ser procesadas.

OptiMethionine®, es un aditivo herbal, compuesto por *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa* y fue provista por Nuproxa Mexico (Indian Herbs y Nuproxa Switzerland). Estos aditivos herbales para alimentación son productos estandarizados y tienen mezclas certificadas, siguiendo las normas ISO 9001 y GMP (*Good Manufacturing Practices*).

Análisis de abundancia relativa por medio de secuenciación masiva.

Se analizaron 24 muestras correspondientes a 8 repeticiones de tres tratamientos seleccionados: control (C), la dosis media del aditivo herbal (Hm, 2.7 g por animal día⁻¹) y la dosis alta (Ha, 3.8 g por animal día⁻¹). Se tomaron alícuotas de 250 µL de cada muestra y se realizó la extracción de ADN metagenómico con el kit ZymoBIOMICS®

(#cat. D4300T), siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación y calidad del ADN obtenido del proceso de extracción se evaluó con un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific); se obtuvieron concentraciones de DNA metagenómico de entre 71.2 ng μL^{-1} (Ha4) y 143.6 ng μL^{-1} (C50). Se enviaron a ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA) 15 μL de cada una de las muestras para que fueran procesadas y analizadas por el servicio de secuenciación dirigida para el análisis de microbiomas.

Preparación de la biblioteca.

La secuenciación del gen bacteriano 16S rRNA se realizó utilizando el kit de preparación de bibliotecas Quick-16S™ NGS (Zymo Research, Irvine, CA). La región V3-V4 de este gen se amplificó con cebadores específicos, diseñados a medida por Zymo Research. La biblioteca agrupada final se limpió con Select-a-Size DNA Clean & Concentrator™ (Zymo Research, Irvine, CA), luego se cuantificó con TapeStation® (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) y Qubit® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, WA). Como control positivo para cada preparación de biblioteca dirigida, se utilizó el estándar de ADN de la comunidad microbiana ZymoBIOMICS® (Zymo Research, Irvine, CA). Se incluyeron controles negativos (es decir, control de extracción en blanco y el control de preparación de biblioteca en blanco) para evaluar el nivel de carga biológica inherente al proceso de extracción.

Secuenciación.

La biblioteca final fue secuenciada en la plataforma Illumina® MiSeq™ con un kit de reactivo v3 (600 ciclos). La secuenciación se realizó con un pico de PhiX al 10%.

Análisis bioinformático.

Se infirieron variantes únicas de secuencias de los amplicones a partir de lecturas sin procesar, utilizando la segmentación DADA2 (Callahan *et al.*, 2016), que sirvió también para eliminar las secuencias quiméricas. La asignación taxonómica se realizó utilizando Uclust de Qiime v.1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010), con la base de datos propia de Zymo. Los análisis de visualización de composición, diversidad alfa y diversidad beta, también se realizaron con Qiime v.1.9.1. La configuración predeterminada de LEfSe (Segata *et al.*, 2011) se utilizó para identificar la taxonomía de los grupos microbianos con mayor abundancia (absoluta y relativa) en las diferentes muestras.

Cuantificación de géneros bacterianos por PCR tiempo real (qPCR)

Para esta estimación se utilizaron mezclas de ADN bacteriano obtenido de líquido ruminal filtrado de los corderos alimentados con OptiMethionine®; las muestras se agruparon en función de la dosis del producto herbal administrado (0, 2.1, 2.7 y 3.8 g por animal día⁻¹) para evaluar los cambios cuantitativos en dos grupos importantes de bacterias, *Prevotella* spp. y *Ruminococcus* spp., la primera es predominante y con una actividad proteolítica destacada y la segunda es reconocida por su actividad celulolítica, por lo que la variación corresponde a las submuestras y no se presenta análisis estadístico entre tratamientos. El ADN bacteriano se extrajo utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), bajo las condiciones sugeridas por el fabricante. La pureza y calidad del ADN se evaluaron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 0.8% (Agarose LE, Analytical Grade, Promega); la cuantificación se realizó por medio de un NanoDrop 2000 (ThermoFisher). La concentración de las muestras se homogeneizó a 50 ng µL⁻¹.

Se diseñaron cebadores para amplificar los 100 primeros pares de bases (pb) de la región v8 del gen 16S RNA (Tabla 1), uno *Forward* que sirvió para todas las amplificaciones (ubicado en una región conservada del gen) y varios *Reverse*, que permitieran la amplificación de un fragmento específico de cada uno de los géneros bacterianos de interés (*Prevotella* spp. y *Ruminococcus* spp.), por estar diseñados en la región hipervariable v8; además de otro que sirviera como control positivo del proceso de amplificación, ya que su secuencia es compatible prácticamente con la secuencia del gen 16S RNA de cualquier bacteria (Bacteria total).

Tabla 1. Características de los cebadores diseñados

Género	Secuencias de los cebadores (5' - 3')	Tamaño del producto (pb)
<i>Forward</i> general	GTGSTGCAYGGYTGTCGTC	
<i>Rev</i> Bacteria total	ACGTCRTCCMCACCTTCCTC	150
<i>Rev Prevotella</i> spp	CCACCTTCCTCACACCTTACGG	140
<i>Rev Ruminococcus</i> spp	GTTTTGTCAACGGCAGTCCTG	129

Bases degeneradas: S: G o C, M: A o C, R: A o G, Y: C o T

Para llevar a cabo la qPCR, se utilizó el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen) bajo las siguientes condiciones:

- Bacteria total: 95°C/1 min, 59°C/1 min, 72°C/1 min; 30 ciclos
- *Prevotella* spp. y *Ruminococcus* spp: 95°C/1 min, 57°C/1 min, 72°C/1 min; 28 ciclos

La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 20 μL :

- 10 μL SYBR Green Master Mix 2x (Thermo Scientific™)
- 1 μL cebador *Fwd* (10 pmol μL^{-1})
- 1 μL cebador *Rev* (10 pmol μL^{-1})
- 1 μL ADN (50 ng μL^{-1})
- 7 μL de H_2O libre de nucleasas

Se realizaron 5 repeticiones de cada muestra. Los productos amplificados se estimaron a partir de una curva estándar. El número de copias del genoma bacteriano se calculó usando la fórmula:

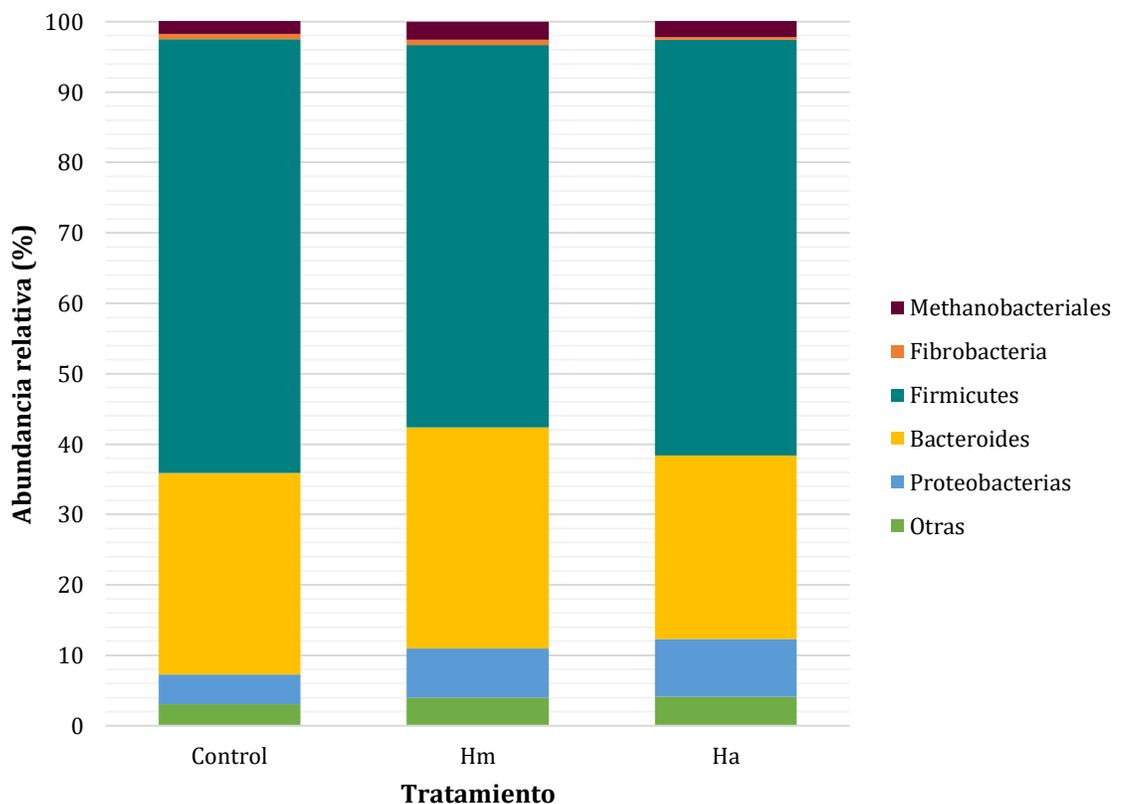
- $\text{No. copias del genoma bacteriano}/\mu\text{L} = (\text{concentración de ADN ng } \mu\text{L}^{-1} * 6.022 * 10^{23}) / (\text{Tamaño del genoma (pb)} * 1 * 10^9 * 650)$

El número de copias de ADN por μL de muestra se consideró como un indicador de la densidad de población de cada género en las muestras. Se hicieron curvas estándar para cada género, para lo cual se amplificaron los productos de interés por PCR punto final (bajo las condiciones antes descritas) y se purificaron con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para hacer las curvas, fue necesario hacer diluciones seriadas de los productos de PCR purificados; las concentraciones de ADN que se utilizaron para hacer la cuantificación fueron: 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 ng μL^{-1} .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Gráfica 1 se presentan las principales Clases de bacterias que cambiaron como resultado del tratamiento con metionina herbal, destacando que se incrementó la abundancia relativa de arqueas metanogénicas (efecto cuadrático $p < 0.10$; Tabla 2), abundancia que podría estar asociada a los protozoarios ya que estos poseen un hidrogenosoma que genera una relación simbiótica con las arqueas metanogénicas (Abrar *et al.*, 2016; Ushida, 2018).

Gráfica 1. Efecto de la Metionina herbal en la abundancia relativa (%) de las principales Clases microbianas ruminales.



El tratamiento con la dosis alta de metionina herbal (Ha) redujo la abundancia relativa de un grupo importante de bacterias que es Firmicutes (efecto cuadrático $p < 0.10$; Tabla

2), respecto al control. Este grupo que incluye bacterias con actividad celulolítica y xilanolítica como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* y *Eubacterium cellulosolvens* (Flint *et al.*, 2008), sin embargo, la Clase específica de Fibrobacterias no fue afectada.

Tabla 2. Efecto de la Metionina herbal en la abundancia relativa (%) de las principales Clases microbianas ruminales.

Clase	Control	Metionina herbal		CV	Lineal	Cuadrático
		2.7 g	3.8 g			
Methanobacteriales	1.8	2.6	2.3	33.91	0.20	0.09
Fibrobacteria	0.8	0.7	0.4	55.54	0.05	0.47
Firmicutes	61.6	54.3	59.0	13.87	0.46	0.06
Bacteroides	28.6	31.4	26.1	11.90	0.15	0.01
Proteobacterias	4.2	7.0	8.2	108.97	0.25	0.79
Otras	3.1	4.0	4.1	21.12	0.11	0.37

CV: coeficiente de variación.

La Clase de bacterias que fue estimulado por el tratamiento con la dosis media de metionina herbal (Hm) fue Bacteroides (efecto cuadrático $p < 0.01$; Tabla 2) que, en rumiantes, incluye a bacterias con actividad amilolítica y xilanolítica como *Prevotella ruminicola* y *Prevotella bryantii* (Flint *et al.*, 2008).

Las Clases bacterianas más abundantes en rumen son Bacteroides y Firmicutes (Xin *et al.*, 2019; Flint *et al.*, 2008) y la proporción de éstas afecta el metabolismo con impacto específico en el contenido de grasa en la leche (Jami *et al.*, 2014), pudiendo repercutir

hasta en el metabolismo de lípidos en sangre, particularmente las modificaciones en la abundancia de Bacteroides (Turnbaugh *et al.*, 2006).

En la Gráfica 2 se presentan las diferencias en la abundancia relativa de las Familias microbianas ruminales en respuesta al tratamiento con metionina herbal, confirmando el incremento en la abundancia de arqueas metanogénicas (efecto cuadrático $p < 0.10$; Tabla 3). *Prevotellaceae* se redujo con la dosis alta de metionina (efecto cuadrático $p < 0.05$; Tabla 3) y, considerando que la *Prevotella* normalmente es una de las Familias más abundantes en la microbiota ruminal (Pitta *et al.*, 2010, 2014), su alteración probablemente haya conducido al incremento de otras Familias como *Ruminococcus*.

Gráfica 2. Efecto de la Metionina herbal en la abundancia relativa (%) de las principales Familias microbianas ruminales.

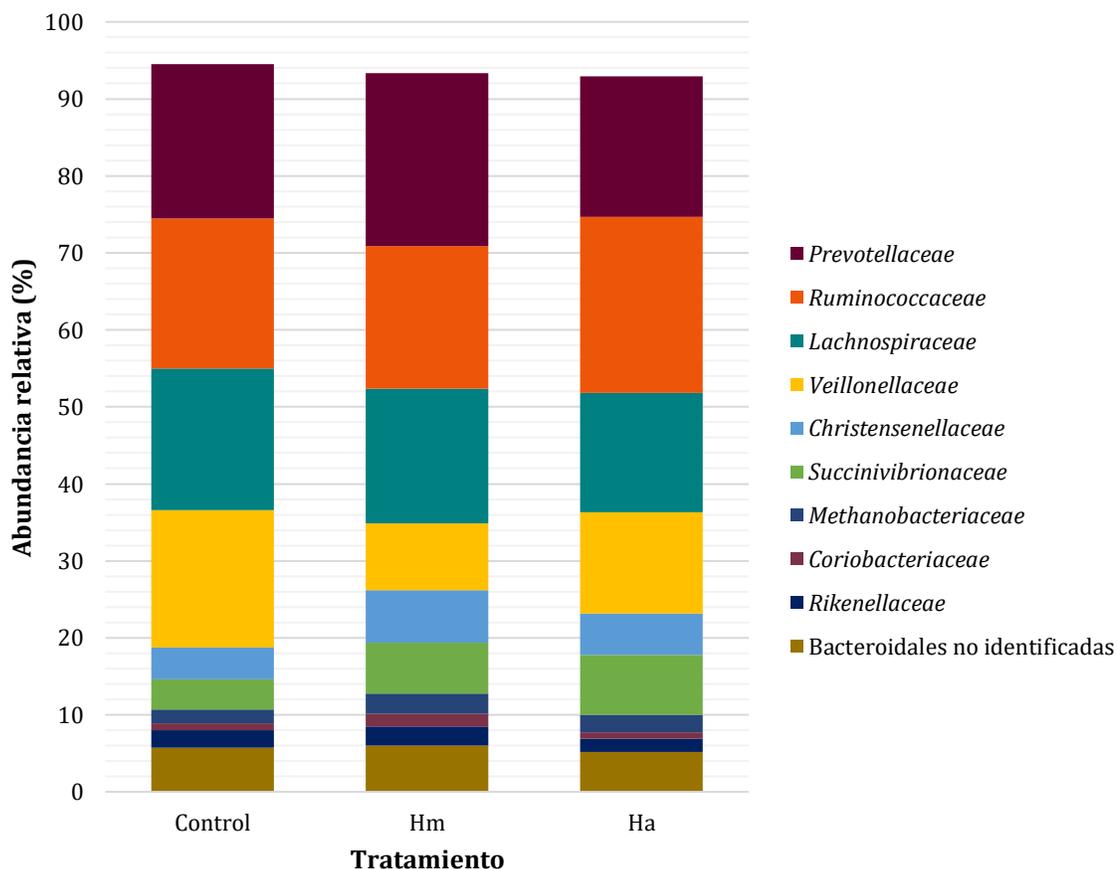


Tabla 3. Efecto de la Metionina herbal en la abundancia relativa (%) de las principales Familias microbianas ruminales.

Familia	Control	Metionina herbal		CV (%)	Lineal	Cuadrático
		2.7 g	3.8 g			
<i>Prevotellaceae</i>	20.05	22.41	18.25	19.17	0.33	0.05
<i>Ruminococcaceae</i>	19.51	18.59	22.85	40.64	0.43	0.48
<i>Lachnospiraceae</i>	18.34	17.46	15.48	45.59	0.48	0.87
<i>Veillonellaceae</i>	17.83	8.71	13.13	66.17	0.26	0.07
<i>Christensenellaceae</i>	4.14	6.79	5.41	38.68	0.18	0.02
<i>Succinivibrionaceae</i>	3.93	6.63	7.76	108.35	0.26	0.79
<i>Methanobacteriaceae</i>	1.79	2.59	2.27	35.48	0.20	0.09
<i>Coriobacteriaceae</i>	0.91	1.64	0.86	81.18	0.91	0.06
<i>Rikenellaceae</i>	2.25	2.50	1.72	33.76	0.13	0.09
Bacteroidales no identificadas	5.76	6.01	5.17	27.02	0.45	0.42

CV: coeficiente de variación.

Veillonellaceae, Familia relacionada con la utilización de lactato (Marounek y Bartos, 1987), disminuyó con dosis intermedias de metionina (efecto cuadrático $p < 0.10$; Tabla 3). La Familia *Christensenellaceae* se incrementó con la dosis de 2.7 gramos OptiMethionine® (efecto cuadrático $p < 0.05$; Tabla 3), aunque su función ruminal no es clara (De Nardi *et al.*, 2016). Sin embargo, su abundancia parece ser el indicador de un pH estable en el rumen (Derakhshani *et al.*, 2017) y se ha reportado que los Géneros comprendidos en ella pueden producir α -arabinosidasas, β -galactosidasas y β -

glucosidasas, enzimas que han sido asociadas con la eficiencia alimenticia (Perea *et al.*, 2017).

La abundancia de la Familia *Coriobacteriaceae* se han correlacionado con el contenido de los isómeros trans-10, cis-12 CLA y trans-10 en la leche (Pitta *et al.*, 2018), lo que ha sugerido que esta Familia bacteriana puede participar en la biohidrogenación ruminal en vías alteradas; en hamsters esta Familia se ha asociado con obesidad, síndrome metabólico e hipercolesterolemia (Martínez *et al.*, 2013).

En otros estudios se ha reportado la presencia de *Rikenellaceae* en el rumen, pero se desconoce su función específica, aunque se sugiere que podría desempeñar un papel importante en la utilización de carbohidratos y nitrógeno (Xin *et al.*, 2019).

Se ha considerado que las hierbas que contienen diversos metabolitos secundarios son potencialmente candidatas para reducir las emisiones de metano y se han estudiado metabolitos de plantas que pueden reducir su producción, al ser evaluados *in vitro*, tales como saponinas (Patra y Yu, 2013), taninos (Bhatta *et al.*, 2015), aceites esenciales (Patra y Yu, 2014) y lípidos (Benchaar *et al.*, 2015). En los últimos años se han desarrollado y registrado más de 200 extractos de plantas en Europa (*Community Register of Feed Additives*), sin embargo, existen pocas evaluaciones *in vivo* que demuestren que pueden reducir las emisiones de metano. En un experimento de Patra *et al.* (2011) donde incluyeron *Allium sativum* la producción de metano no fue reducida.

Cuantificación de géneros bacterianos por PCR tiempo real (qPCR)

En la Tabla 4 se presenta la concentración de las principales bacterias ruminales en las mezclas de ADN bacteriano obtenido de líquido ruminal filtrado de los corderos

alimentados con OptiMethionine®. En términos, relativos se puede observar que el producto polihierbal incrementó la concentración de proteína microbiana en las dosis baja y media, y las redujo con la dosis más alta (3.8 g d⁻¹, Grafica 3). La concentración de *Prevotella* sigue esta misma tendencia, sin embargo, presenta la mayor concentración con la dosis intermedia; la proporción confirma su predominancia en el rumen (Pitta *et al.*, 2010, 2014). La concentración de *Ruminococcus* siguió la misma tendencia que las bacterias totales pero su proporción se mantuvo relativamente constante.

Tabla 4. Efecto de Metionina herbal en la concentración de las principales bacterias ruminales (ng μL^{-1} de DNA).

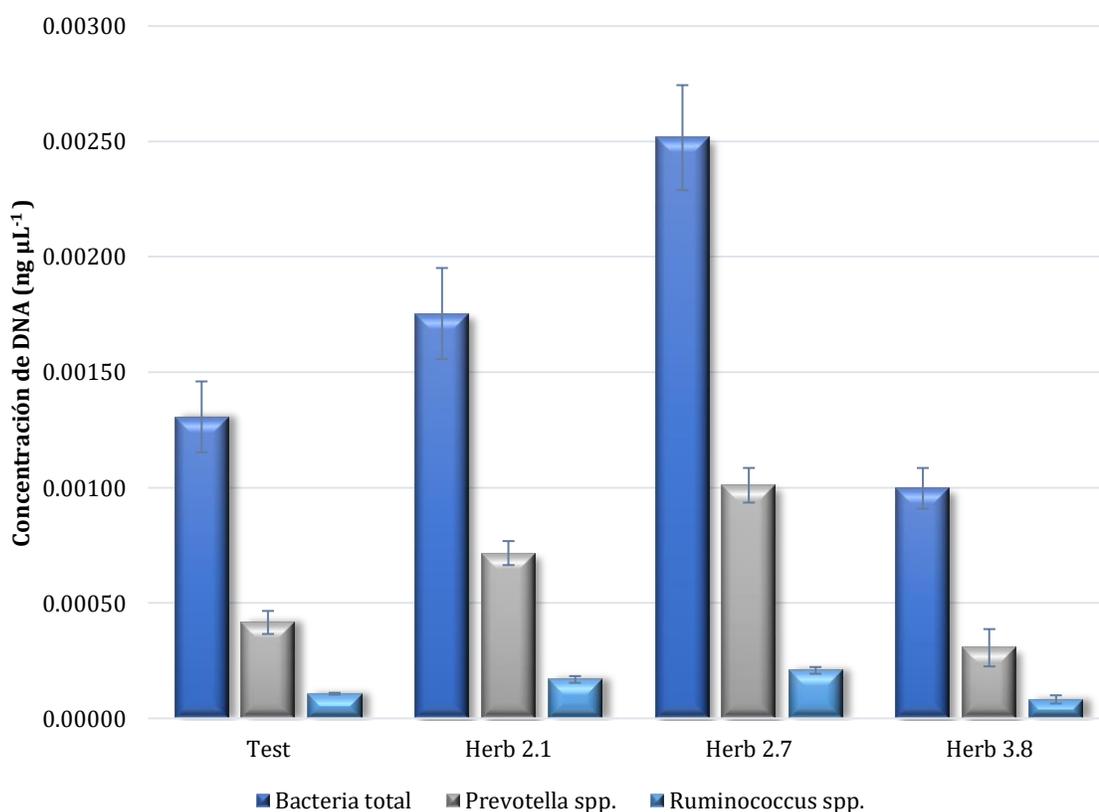
OptiMethionine® g d ⁻¹	Bacteria total	CV (%)	<i>Prevotella</i> spp	CV (%)	<i>Ruminococcus</i> spp	CV (%)
0	0.00131	11.75	0.00042	12.03	0.00011	3.77
2.1	0.00175	11.26	0.00072	7.28	0.00017	8.60
2.7	0.00252	9.04	0.00101	7.44	0.00021	6.97
3.8	0.00100	8.85	0.00031	26.42	0.00008	21.57

Optimet: OptiMethionine® (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativa*)

Los metabolitos secundarios presentes en las plantas que conforman la mezcla herbal de Metionina (*Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativum*) tienen efecto sobre las bacterias, arqueas y protozoarios presentes en el rumen de los animales que fueron alimentados con el aditivo polihierbal. El contenido de este tipo de metabolitos depende de la parte de la planta usada (semilla, hojas, tallos, etc) para hacer el aditivo, y se ha reportado la presencia de saponinas esteroidales, alcaloides, fibra soluble e insoluble con galactomananos, fosfolípidos y un factor galactogogo (Srinivasan, 2006). Se ha

identificado diosgenina, como su principal sapogenina esteroidea, y trigonelina alcaloide, ambos de interés farmacológico por sus efectos hipocolesterolémicos e hipoglucémicos (Bahmani *et al.*, 2016; Mehrafarin *et al.*, 2018). La semilla de *Trigonella foenum-graecum* además contiene proteínas como la albúmina, compuestos fenólicos, flavonoides, aceites volátiles, cumarinas, vitaminas (A, B1, B2, C, niacina y ácido nicotínico, aminoácidos libres (arginina, histidina, lisina y 4-hidroxiisoleucina) y minerales (Ca, Fe, Mn, P, Zn) (Asim *et al.*, 2018).

Gráfica 3. Efecto de Metionina herbal en la concentración de las principales bacterias ruminales.



Allium sativum es una planta que contiene vitaminas, minerales y oligoelementos, entre los que se encuentran germanio y selenio. La alicina da el olor característico al ajo y se considera responsable de algunas actividades farmacológicas de la planta (Coppi *et al.*, 2006); a los extractos de bulbo de *Allium sativum* se les atribuyen propiedades antioxidantes y antimicrobianas probadas contra bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Escherichia coli* y *Klebsiella*), además de actividad antifúngica, contra *Candida albicans* (Balaji, 2012). Otros estudios han evaluado la actividad del extracto de la planta contra *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* y han asociado su actividad antimicrobiana a la presencia de taninos (Lawal *et al.*, 2016).

CONCLUSIÓN

Los resultados de la abundancia de bacterias con el uso de metionina herbal (OptiMethionine®) muestran que se incrementa la concentración de proteína microbiana principalmente a una dosis media, asimismo se observan cambios en diferentes Clases y Familias bacterianas lo que podría estar contribuyendo con parte de los efectos positivos que se observan en parámetros productivos de los corderos en crecimiento.

REFERENCIAS

- Aasim, M., Baloch, F.S., Nadeem, M.A., Bakhsh, A., M. Sameeullah, M., and Day, S. (2018). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.): An underutilized edible plant of

- modern world. *Global Perspectives on Underutilized Crops*, 381–408. doi:10.1007/978-3-319-77776-4_12.
- Abrar, A., Watanabe, H., Kitamura, T., Kondo, M., Ban-Tokuda, T., and Matsui, H. (2016). Diversity and fluctuation in ciliate protozoan population in the rumen of cattle. *Animal Science Journal*, 87:1188-1192. doi:10.1111/asj.12591.
- Ariga, T., Oshiba, S., and Tamada, T. (1980). Platelets aggregation inhibition in garlic. *Lancet*, 1:150.
- Bahmani, M.H., Shirzad, M., Mirhosseini, A., Mesripour, M., and Rafieian K. (2016). A Review on Ethnobotanical and Therapeutic Uses of Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L). *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 21:53-62.
- Balaji, M.B., Mopuri, R., and MuraliKrishna, T. (2012). Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5:391-395.
- Callahan, B.J., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J., and Holmes, S.P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13:581. doi: 10.1038/nmeth.3869
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Gonzalez, P.A., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J. and Knight R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*, 7: 335-336. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Coppi, A., Cabinian, M., Mirelman, D., and Sinnis, P. (2006). Antimalarial activity of allicin, a biologically active compound from garlic cloves. *Antimicrob. Agents Chemother*, 50: 1731-1737.
- De Nardi, R., Marchesini, G., Li, S., Khafipour, E., Plaizier, K.J., Gianesella, M., Ricci, R., Andrighetto, I., and Segato, S. (2016). Metagenomic analysis of rumen microbial population in dairy heifers fed a high grain diet supplemented with dicarboxylic

- acids or polyphenols. *BMC Veterinary Research*, 12:29. doi:10.1186/s12917-016-0653-4.
- Derakhshani, H., Tun, H.M., Cardoso, F.C., Plaizier, J.C., Khafipour, E., and Loor, J.J. (2017). Linking peripartal dynamics of ruminal microbiota to dietary changes and production parameters. *Frontiers in Microbiology*, 7:2143. doi.org/10.3389/fmicb.2016.02143
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6:121-131.
- Jami, E. B.A. White, and I. Mizrahi (2014). Potential role of the bovine rumen microbiome in modulating milk composition and feed efficiency. *PLoS One*, 9 (2014), p. e85423
- Lawal, B., Shittu O.K., Oibiokpa, F.L., Mohammed, H., Humar, S.I., and Haruna G.M. (2016). Antimicrobial evaluation, acute and sub-acute toxicity studies of *Allium sativum*. *Journal of Acute Disease*, 5: 296–30.
- Martínez, I., Perdicaro, D.J., Brown, A.W., Hammons, S., Carden, T.J. Carr, T.P. Eskridge, K.M. and Walter J. (2013). Diet-induced alterations of host cholesterol metabolism are likely to affect the gut microbiota composition in hamsters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79: 516-524.
- Marounek, M., and Bartos, S. (1987). Interactions between rumen amylolytic and lactate-utilizing bacteria in growth on starch. *J. Appl. Bacteriol.*, 63:233-8.
- Mehrafarin, A., Qaderi, A., Rezazadeh, S.H., Naghdi, B.H., Noormohammadi, G.H., and Zand, E. (2010). Bioengineering of Important Secondary Metabolites and Metabolic Pathways in Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). *Journal of Medicinal Plants*, 9:1-18.
- Mendoza, G.D., Oviedo, M.F., Pinos, J.M., Lee-Rangel, H.A., Vázquez, A., Flores, R., and Pérez, F. (2019). Milk production in dairy cows supplemented with herbal choline and methionine. *Rev. FCA UNCUYO*, 1853-8665.
- Patra, A.K., Kamra, D.N., Bhar, R., Kumar, R., and Agarwal, N. (2011). Effect of *Terminalia chebula* and *Allium sativum* on in vivo methane emission by sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 95:187–191.

- Patra, A.K., and Yu, Z. (2013). Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. *Bioresource Technology*, 148:352-360.
- Patra, A.K., and Yu, Z. (2014). Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on in vitro fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:897-905.
- Perea, K., Perz, K., Olivo, S.K., Williams, A., Lachman, M., Ishaq, S.L., Thomson, J., and Yeoman, C.J. (2017). Feed efficiency phenotypes in lambs involve changes in ruminal, colonic, and small-intestine-located microbiota. *J. Anim. Sci.* 95 2585–2592.
- Pitta, D.W., Indugu, N., Vecchiarelli, B., Rico, D.E., and Harvatine, K.J. (2018). Alterations in ruminal bacterial populations at induction and recovery from diet-induced milk fat depression in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 101(1):295-309.
- Pitta, D.W., Kumar, S., Vecchiarelli, B., Shirley, D.J., Bittinger, K., Baker, L.D., Ferguson, J.D., and Thomsen N. (2014). Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period. *J. Anim. Sci.*, 92(9):4014-22.
- Pitta, D.W., Pinchak, .W.E., Dowd, S.E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., and Fulford, J. (2010). Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.*, 59: 511-522.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W.S., and Huttenhower, C. (2011). Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.*, 12: R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
- Srinivasan, K. (2006). Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*): A Review of Health Beneficial Physiological Effects. *Food Reviews International*, 22:203-224
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444: 1027-1131.
- Ushida, K. (2018). Symbiotic methanogens and rumen ciliates. In (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. Springer Cham, 25-35.

Xin, J., Chai, Z., Zhang, C., Zhang, Q., Zhu, Y., Cao, H., Zhong, J., & Ji, Q. (2019). Comparing the microbial community in four stomach of dairy cattle, yellow cattle and three yak herds in Qinghai-Tibetan Plateau. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1547. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01547>

CONCLUSIONES GENERALES.

Los resultados obtenidos indican que las dos mezclas herbales (OptiLysine® y OptiMethionine®) son resistentes a la degradación ruminal y su contenido de aminoácidos no permite hacer una sustitución equivalente de los productos sintéticos.

La mezcla polihierbal hecha a base de *Phaseolus mungo* y *Linum usitatissimum* (OptiLysine®; 5, 10 y 15 g por animal día⁻¹) y la lisina sintética protegida de la degradación ruminal (5, 10 y 15 g por animal día⁻¹), no mejoraron el crecimiento de los corderos, pero tuvieron efecto en las poblaciones de protozoos del rumen presumiblemente por mecanismos de acción diferentes.

La mezcla herbal hecha a base de *Trigonella foenum-graecum* y *Allium sativum* (OptiMethionine®) logró mostrar una respuesta de crecimiento equivalente al 93% de una lisina sintética protegida de la degradación ruminal, presumiblemente por medio de sus múltiples efectos en el metabolismo del animal y de la microbiota.

REFERENCIAS

- Araújo, C., Macedo, J., Oliveira, K., Varanis, L., Assis, T., & Siqueira, M. (2019b). Effect of the inclusion of lysine and methionine on the nutritional performance and ingestive behavior of lambs. *Semina: Ciências Agrárias*. 40(2), 957-970. DOI: 10.5433/1679-0359.2019v40n2p957.
- Cuellar A. Perspectivas de la producción ovina en México para el año 2010. *La revista del borrego*, 2007; 47.
- Giallongo, F.; Harper, M. T.; Oh, J.; Lopez, J. C.; Lapierre, H.; Patton, R. A.; Parys, C.; Shinzato, I.; Hristov, A. N. Effects of rumen-protected methionine, lysine and histidine on lactation performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 2016; 99: 4437 – 4452.
- Knowless, M. M.; Pabón, M. L.; Hess, H. D.; Carulla, J. E. Changes in *in vitro* ruminal and postruminal degradation of tropical tannin rich legumes due to varying levels of polyethylene glycol. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2017;101(14): 641-648.
- Manh, N. S.; Wanapat, M.; Uriyapongson, S.; Khejornsart, P.; Chanthakhoun, V. Effect of eucalyptus (*Camaldulensis*) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. *Afr. J. Agric. Res.* 2012; 7(13): 1997-2003.
- Mendoza NP, Mendoza MG, Herrera HJ, Ruiz SB, Bárcena GR y Tarango AL. Effect of ruminally protected methionine on body weight gain and growth of antlers in red deer (*Cervus elaphus*) in the humid tropics. *Tropical Animal Health and Production*, 2011; 44:681 – 684.
- Odeidat BS, Adbullah AY, Awawdeh MS, Kridli RT, Titi HH y Qudsieh RI. Effect of methionine supplementation on performance and carcass characteristics of Awassi ram lambs fed finishing diets. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 2008; 21:831 – 837.
- Oke BO, Loerch SC y Deetz LE. Effects of rumen protected methionine and lysine on ruminant performance and nutrient metabolism. *Journal of Animal Science*, 1986; 62:1101 – 1112.

- Ordway R y Aines G. Feeding lysine: A nutritionist and dairy producer's perspective. Memorias de "The High Plains Dairy Conference". 2010; 109 – 116.
- Prado TF, Franca AF, Meirinhos MG, Peron, HJ, Ferreira RN, Oliveira LG y Correa DS. Animal performance and carcass characteristics from confined lambs fed on concentrate feed and additives. Anais da Academia Brasileira de Ciencias 2015; 87:2255 – 2263.
- Raja, A. I.; Abbasi, F.; Abd, M. E.; Abdel-Lafit, M. A.; Soomro, R. N.; Hayat, K.; Mohamed, M. A.; Bodinga, B. M.; Yao, J.; Cao, Y. 2017. Critical analysis of excessive utilization of crude protein in ruminants ration: impact on environmental ecosystem and opportunities of supplementation of limiting amino acids-a review. Environ. Sci. Pollut. Res. 25(1): 181-190.
- Torre C y Caja G. Utilización de aditivos en rumiantes: Vitaminas y aminoácidos protegidos. Memorias del XIV Curso de Especialización Avances en Nutrición y Alimentación Animal. 1998.
- Vargas VO y Elizondo SJ. Respuesta productiva del ganado lechero ante el suministro de metionina sintética. Nutrición Animal Tropical, 2015; 9: 24 – 38.
- Vasta V y Luciano G. The effects of dietary consumption of plants secondary compounds on small ruminants' products quality. Small Ruminant Research, 2011; 101: 150 – 159.