

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE CIENCIAS

UTILIZACIÓN DE DIVERSAS LEGUMINOSAS GRANO  
EN LA PRODUCCIÓN DE LA LECHE DE CABRA.  
ANÁLISIS DE SU VALOR NUTRITIVO Y CALIDAD DE  
LA LECHE PRODUCIDA.

*Eva Ramos Morales*  
*Granada, 2006*

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Eva Ramos Morales  
D.L.: Gr. 2534 - 2006  
ISBN: 84-338-4190-4

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	1
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	7
2.1. LAS LEGUMINOSAS GRANO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL	7
2.1.1. Composición química de las leguminosas grano.	8
2.1.2. Valor nutritivo de las leguminosas grano	12
Monogástricos.	12
Rumiantes	12
Degradabilidad ruminal de la proteína	13
Digestibilidad <i>in vivo</i>	14
Tratamiento tecnológico de las leguminosas grano: influencia sobre su valor nutritivo.	15
Ingesta y producción de leche	17
2.2. COMPOSICIÓN Y CALIDAD DE LA LECHE DE CABRA	19
2.2.1 Composición de la leche. Aspectos comparativos entre las leches de cabra, vaca y oveja	20
2.2.2. Composición y características de la proteína.	21
2.2.3. Composición de la grasa. Perfil en ácidos grasos.	23
2.2.4. Aspectos saludables de la leche de cabra	25
Ácidos grasos	25
Proteína	26
2.3. VALOR PROTEICO DE ALIMENTOS PARA RUMIANTES EN LACTACIÓN	28
2.3.1 Microbiota ruminal	29
2.3.2. Degradación ruminal de la proteína	30
Metodologías para la estimación de la degradabilidad ruminal	34
2.3.3. Síntesis de proteína microbiana	37
2.3.4. Proteína de la dieta no degradada en el rumen	39
Estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen.	41
2.4. EFECTO DE LA CALIDAD DE LA DIETA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE RUMIANTES.	42
2.4.1. Control de la ingesta por el rumiante	42
2.4.2 Efecto de la ingesta de energía sobre la producción y composición de la leche.	43
Digestión y metabolismo de los ácidos grasos.	43
Efecto de la ingesta de carbohidratos sobre la producción y composición de la leche.	45

Efecto de la suplementación de la dieta con grasa sobre la producción y composición de la leche.	46
2.4.3 Efecto de la fuente proteica sobre la producción y composición de la leche.	48
2.4.4. Consecuencias de la manipulación de la dieta sobre el valor tecnológico y la calidad organoléptica de la leche.	51
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
3.1. LEGUMINOSAS Y DIETAS EXPERIMENTALES	55
3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	55
3.2.1. Degradabilidad ruminal <i>in situ</i>	55
Corrección de los valores de degradabilidad teniendo en cuenta la pérdida de partículas	57
3.2.2 Digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen	57
Técnica <i>in situ-in vitro</i> (Calsamiglia y Stern, 1995)	57
Técnica <i>in vitro</i> (McNiven et al., 2002)	58
3.2.3 Ensayos <i>in vivo</i> de valoración nutritiva y producción láctea	59
Animales y diseño experimental	59
Desarrollo de los ensayos	60
3.2.4. Elaboración de queso	60
3.2.5. Cinética de coagulación. Obtención de optigramas	61
3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS	61
3.3.1. Materia seca	61
3.3.2. Materia orgánica	62
3.3.3. Grasa	62
3.3.4. Energía bruta	62
3.3.5. Componentes fibrosos	63
Fibra neutro detergente (FND)	63
Fibra ácido detergente (FAD)	63
Lignina ácido detergente (LAD)	64
3.3.6. Componentes nitrogenados.	64
Proteína bruta	64
Aminoácidos de la proteína de las leguminosas y de su fracción no degradable en el rumen	64
3.3.7. Fracciones proteicas de la leche	67
Nitrógeno no caseínico	67
Nitrógeno no proteico	67
3.3.8. Grasa de la leche	68
3.3.9. Ácidos grasos de la leche	68

Esterificación de ácidos grasos	68
Identificación de ácidos grasos	68
3.3.10. Taninos condensados	69
Obtención de los extractos	69
Análisis espectrofotométrico de los taninos condensados	70
3.4 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS	71
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>75</b>
4.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA	75
4.1.1. Leguminosas grano	75
4.1.2. Otros ingredientes de las dietas	79
4.1.3. Composición de las dietas experimentales	79
4.2. CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN EN EL RUMEN DE LAS LEGUMINOSAS Y DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES. EFECTO DE LA CORRECCIÓN PARA LA PÉRDIDA DE PARTÍCULAS	80
4.2.1. Leguminosas	80
4.2.2. Dietas experimentales.	83
4.3. PERFIL AMINOACÍDICO DE LA PROTEÍNA DE LAS LEGUMINOSAS Y DE SU FRACCIÓN NO DEGRADADA EN EL RUMEN	89
4.4. DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DE LA PROTEÍNA NO DEGRADADA EN EL RUMEN.	99
4.5. INGESTA, EXCRECIÓN FECAL Y DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LOS DISTINTOS NUTRIENTES Y DE LA ENERGÍA. CONTENIDO EN PROTEÍNA Y ENERGÍA DIGESTIBLE DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.	104
4.6. UTILIZACIÓN METABÓLICA DEL NITRÓGENO PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE.	107
4.7. UTILIZACIÓN METABÓLICA DE LA ENERGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE	112
4.8. PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE	114
4.8.1. Producción de leche y de sus componentes principales.	114
4.8.2. Perfil en ácidos grasos de la leche	118
4.9. CALIDAD TECNOLÓGICA DE LA LECHE	121
4.10. PATRÓN DE RELACIÓN ENTRE LA NATURALEZA DE LAS FUENTES PROTEICAS Y LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA LÁCTEA: ANÁLISIS MULTIVARIANTE FACTORIAL	124
<b>5. RESUMEN Y CONCLUSIONES/ SUMMARY AND CONCLUSIONS</b>	<b>131</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>143</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición en ingredientes de las dietas (g/kg dieta)	55
Tabla 2. Diseño de los ensayos in vivo	60
Tabla 3. Composición química de las leguminosas grano	76
Tabla 4. Composición en ácidos grasos (% de MS)de las leguminosas grano	76
Tabla 5. Composición química del heno de alfalfa, maiz y avena	79
Tabla 6. Composición química de la fracción concentrado	80
Tabla 7. Características de la degradación ruminal de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las leguminosas grano	81
Tabla 8. Características de la degradación ruminal sin corregir y corregidas para la pérdida de partículas, de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las leguminosas grano..	82
Tabla 9. Características de la degradación ruminal de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las dietas experimentales.	84
Tabla 10. .Características de la degradación ruminal de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las dietas, corregidas y sin corregir para la pérdida de partículas.	85
Tabla 11. Composición aminoacídica de la proteína de las leguminosas grano y de su fracción no degradable en rumen (mg de aa/g de MS).	90
Tabla 12. Composición aminoacídica de la proteína de las leguminosas grano y de su fracción no degradable en rumen (g aa/ 100 g de aa).	91
Tabla 13. Valores de los aminoácidos de las leguminosas originales y de su fracción no degradada en el rumen. Resultados del análisis multivariante factorial	94
Tabla 14. Perfil en aminoácidos esenciales (% del total de AAE) de la proteína de la leche de cabra (Posati y Orr, 1976) y porcentaje de aminoácidos esenciales, en relación a los de la leche, de la proteína original y de su fracción no degradable en el rumen de las leguminosas grano	97
Tabla 15. Perfil en aminoácidos considerados limitantes para la síntesis de proteína en leche (% del total de AAE) de la proteína de la leche de cabra (Posati y Orr, 1976) y de la proteína original y de su fracción no degradable en el rumen de las leguminosas grano. Calculo del índice MPS	98
Tabla 16. Degradación ruminal (DRPB, %), digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR, %) y digestibilidad total (DTPB, %) de la proteína bruta de las leguminosas grano y las dietas completas.	99
Tabla 17. Ingesta (g MS/día), excreción fecal (g MS/día) y digestibilidad aparente (%) media de los distintos nutrientes de las dietas experimentales y de la energía. Contenido en energía (MJ/kg MS) y proteína digestible (g/kg) de las dietas.	104
Tabla 18. Valores de ingesta y balance de nitrógeno (g/kg <sup>0,75</sup> día). Relaciones indicativas de su utilización.	108
Tabla 19. Valores de ingesta y balance de energía (kJ/kg <sup>0,75</sup> día). Relaciones indicativas de su utilización.	112
Tabla 20. Producción y composición de la leche procedente de cabras que consumían dietas que incluían cuatro leguminosas distintas	115

Tabla 21. Composición en ácidos grasos (% de MS) de la leche producida por los animales alimentados con las distintas dietas experimentales	118
Tabla 22. Rendimientos queseros (R1 y R2) y parámetros obtenidos por coagulometría (R, AR, A2R), según el consumo de las distintas dietas	122
Tabla 23. Ecuaciones de predicción del rendimiento quesero, según Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006).	123
Tabla 24. Rendimientos queseros de las leches producidas bajo el consumo de las dietas experimentales, calculados mediante las ecuaciones propuestas por Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006).	123
Tabla 25. Variables que definen la naturaleza de la proteína de las leguminosas, así como el aporte de aminoácidos esenciales de su fracción no degradada en el rumen, y valores de producción de proteína láctea (caseínas y proteínas del suero). Resultados del análisis multivariante factorial.	126



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Producción de proteína de leguminosas (toneladas) y requerimientos proteicos de caprino (toneladas) en España.	8
Figura 2 Degradación de la proteína en el rumen. Fuente: Bach et al. (2005).	32
Figura 3 Digestión y metabolismo de los componentes nitrogenados en el rumen. Fuente: Adaptado de McDonald (1995).	33
Figura 4 Degradación de los carbohidratos en el rumen. Fuente: France y Siddons (1993).	38
Figura 5 Vías de hidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono y transferencia y transformación en la glándula mamaria. Fuente: Chilliari et al. (2003).	44
Figura 6 Porcentaje de desaparición de la proteína, sin corregir o corregido para la pérdida de partículas, de las leguminosas grano en el rumen, en relación al tiempo de incubación.	83
Figura 7 Porcentaje de desaparición de la proteína, sin corregir o corregido para la pérdida de partículas, de las dietas experimentales en el rumen, en relación al tiempo.	86
Figura 8 Efecto de la incubación ruminal sobre el perfil aminoacídico de las leguminosas	95
Figura 9 Relación lineal entre los valores de digestibilidad total de la proteína bruta (DTPB, %) estimados mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995), tras 16 horas de incubación ruminal en caprino, y la DTPB estimada a partir de la técnica de McNiven et al. (2002), tras incubación en proteasa durante 24 horas	100
Figura 10 Relación lineal entre los valores de digestibilidad de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR, %) estimados mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995), tras 16 horas de incubación ruminal en caprino, y la DIPNDR estimada a partir de la técnica de McNiven et al. (2002), tras incubación en proteasa durante 24 horas.	100
Figura 11 Relaciones establecidas entre el balance de nitrógeno respecto al ingerido (BN/NI) y el nitrógeno derivado a leche respecto al balance de nitrógeno (NL/BN) y el nitrógeno retenido con respecto al balance de nitrógeno (NR/BN), para las dietas que incluían habas, altramuza, yeros y veza.	109
Figura 12. Situación de las variables que definen la naturaleza de las leguminosas (IPLD: ingesta de proteína lentamente degradable; IPRD: ingesta de proteína rápidamente degradable; IPND: ingesta de proteína no degradada en el rumen), así como el aporte de aminoácidos esenciales de la IPND, y la producción de proteína láctea (caseína y proteína sérica), en relación a los dos factores derivados. Área de dispersión de las unidades experimentales, según la leguminosa consumida, en relación a los dos factores derivados.	127



## **1.INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

---



## **1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**

En España y en otros países del sur de Europa, a finales de los años 60, se produjo una reducción importante del uso de las leguminosas grano en la alimentación animal, lo que dió lugar a un descenso considerable de su producción. Este descenso, según Moreno (1983), se debió a diferentes razones: 1) el éxodo de la población rural a las zonas industriales, que implicó el abandono de áreas de agricultura tradicional, en las que las leguminosas grano eran indispensables para la alimentación animal y humana así como para el mantenimiento de la fertilidad del suelo; 2) la falta de mejoras genéticas, que ha hecho que se mantengan las mismas variedades de las leguminosas autóctonas, y tecnológicas en cuanto al cultivo de estas plantas, cuyos rendimientos han permanecido prácticamente iguales a lo largo de los años. Por el contrario, la superficie de cultivo y la producción de las leguminosas hortícolas o de verdeo ha aumentado, como consecuencia del cambio en las variedades y técnicas de cultivo ante la demanda social; 3) la pérdida de competitividad en el precio de las leguminosas autóctonas como fuentes proteicas en relación a la soja.

Como consecuencia de todo lo anterior, se produjo un gran desequilibrio entre la demanda y la producción de alimentos ricos en proteína para la alimentación animal, especialmente en aquellos países con sistemas de producción intensivos. En un intento de paliar este déficit de proteína para la alimentación animal, se recurrió a la importación de soja procedente principalmente de Estados Unidos y al uso de harinas de subproductos de mataderos. El empleo de dichas harinas en la alimentación de rumiantes se fue generalizando hasta su prohibición, como consecuencia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), en 1988 y 1994, en el Reino Unido y la Unión Europea, respectivamente. En el 2001, tras la aparición de nuevos casos de EEB en la Unión Europea, las harinas cárnicas se prohibieron para la alimentación animal retirándose del mercado, prohibición que se mantiene en la actualidad. Ante esta situación, se incrementó la demanda de soja, elevándose el grado de dependencia exterior del sector ganadero europeo. Tanto la crisis de la EEB, como la situación producida en los años 1972-1973, con respecto al embargo americano a la exportación de soja, hizo que se tuviera conciencia del riesgo que supone la dependencia de algo tan importante como las fuentes de proteína para la producción animal, así como la necesidad de buscar alternativa a la torta de dicha oleaginosa.

En cuanto al cultivo de soja, objeto de diversos intentos en España, los resultados han sido de escasa incidencia debido a la falta de variedades adecuadas a nuestras condiciones climáticas, elevados costes de producción, etc. En la actualidad, aproximadamente el 75% de las necesidades de proteína vegetal de la Unión Europea se cubren a partir de recursos importados de otros países, fundamentalmente de soja procedente de Estados Unidos. Las importaciones de soja en España, desde 1993 hasta 2003, se situaron en torno a los 2-3 millones de toneladas (FAOSTAT, 2006). En este

contexto, las leguminosas grano pueden ser una alternativa de interés en la sustitución de la soja y de las harinas cárnica en los piensos.

Las medidas adoptadas por la Política Agraria Comunitaria (PAC) en 1994, provocaron un aumento de la superficie dedicada al cultivo de ciertas especies de leguminosas como guisantes, habas y altramuces dulces (grupo de “proteaginosas” dentro de la Organización Común de Mercados de Cultivos Herbáceos) y garbanzos, lentejas, yeros y vezas, estas dos últimas para el consumo animal (grupo de “leguminosas con ayuda específica”). Por el contrario, se perjudicó a aquellas leguminosas excluidas de los programas comunitarios lo que incidió en la disminución de la biodiversidad de este grupo vegetal. En 2001, se constituyó el Plan Andaluz Coordinado de lucha contra la EEB, entre cuyos fines destacó el establecimiento de un plan especial de experimentación y desarrollo de leguminosas y proteaginosas para alimentación animal, contexto en el que se planteó el trabajo que se expone en la presente memoria. En el año 2003 se aprobó la reforma de la PAC, en la que seguían existiendo primas y ayudas al cultivo de determinadas leguminosas: proteaginosas (guisantes, haboncillos y altramuces dulces), lentejas, garbanzos, vezas y yeros, y otras semillas. Por un lado, las medidas adoptadas por la PAC limitarían el cultivo de las leguminosas no contempladas en los regímenes de ayuda, con la consiguiente pérdida de diversidad genética; por otro lado, favorecería el cultivo de los dos grupos de leguminosas grano beneficiarios de ayudas, citados anteriormente. Este hecho dio lugar a la distribución de la superficie dedicada al cultivo de leguminosas grano en el año 2003 en España. Exceptuando la superficie destinada a las judías, la que ocupan habas, lentejas, garbanzos, guisantes, veza, altramuz y yeros supone aproximadamente el 98% de la destinada a leguminosas.

En los últimos años la superficie de siembra de leguminosas grano en España se ha estabilizado en torno a 500.000 ha, incrementándose de 319.000 ha en 1990 a las 508.000 ha en el 2003, debido principalmente a las ayudas de la P.A.C., que además de subvencionar las superficies cultivadas, permite el cultivo de ciertas especies de este grupo en parcelas procedentes del arranque del viñedo (MAPA, 2004).

Francia y España han sido tradicionalmente países productores de leguminosas grano, aunque difieren en las especies producidas. En general, el guisante es la especie más importante en Francia y en el centro y norte de Europa, mientras que en la Europa mediterránea lo son las habas, garbanzos, yeros y vezas. Según el balance de leguminosas grano en España durante la campaña 2002/2003 (MAPA, 2006), la producción utilizable de las leguminosas consideradas en este estudio fue de 48,5, 13,1, 131,2 y 96,3 miles de toneladas para habas, altramuz, veza y otras especies del género vicia, respectivamente siendo su principal destino la alimentación animal. Con respecto a Andalucía la producción durante el año 2003 (MAPA, 2006) fue de 75, 6, 2 y 0,5%, respectivamente para habas, altramuz, veza y yeros. Los mayores productores de veza, yeros y altramuz fueron Castilla la Mancha y Castilla y León.

En las zonas mediterráneas de la Unión Europea, y concretamente en Andalucía, existe una gran extensión de terrenos adecuados para la siembra de leguminosas grano y/o forrajeras, puesto que se trata de superficies de barbecho y tierras en retirada, cultivos que por otro lado, contribuirían a la mejora de los suelos de secano al aumentar la población de bacterias fijadoras de nitrógeno. Además, para la región mediterránea, de ecosistemas áridos y semiáridos, se ha propuesto como alternativa con mayores posibilidades productivas y conservadoras del medio, el uso ganadero de las leguminosas (Boza, 1993), en sistemas extensivos o semiextensivos sostenibles, lo que contribuiría a generar empleo durante todo el año, así como a la estabilidad demográfica de esas zonas. En ambientes áridos y semiáridos, la cabra sería la especie animal de elección dada su capacidad de adaptación a dichas zonas y el elevado valor de sus producciones, siendo Andalucía la zona de España más importante en lo que a producción de leche de cabra se refiere. De los 486,8 millones de litros de leche de cabra producidos en el año 2003 en España, 239,6 millones se obtuvieron en Andalucía (MAPA 2006). El interés actual por la leche de cabra se centra, fundamentalmente, en su empleo para la producción de queso, vislumbrándose la posibilidad de su utilización como base de otros derivados lácteos, dada su calidad, no solo nutritiva sino también saludable (Boza, 2005).

Por tanto, la producción de leguminosas grano, con destino a la ganadería, en Andalucía tendría efectos económicos, medioambientales y sociales positivos, y podría permitir mejorar y aumentar la producción de alimentos tradicionales, con denominación de origen y ecológicos, no excedentarios y con una elevada incidencia en la seguridad alimentaria. Ello supone desarrollar un cultivo con un modelo de agricultura multifuncional. Además, de esta manera, se controlaría la producción desde el origen de la materia prima hasta el producto final, asegurándose la utilización exclusiva de alimentos de origen vegetal en la alimentación de rumiantes (Boza, 2004). Sin embargo, la situación actual en España, está todavía lejos de este planteamiento. El impulso al cultivo de leguminosas grano estaría justificado por el bajo rendimiento promedio de los cultivos y, en consecuencia, la necesidad de obtener nuevas variedades pero, especialmente y para conseguir su adecuado empleo en la alimentación del ganado, de conocer su composición y valor nutritivo, así como su influencia en la producción y calidad nutritiva y saludable de los alimentos obtenidos en base a ello (carne y leche).

En relación a la leche de cabra, se conoce que la dieta ejerce un claro efecto sobre la cantidad producida y la calidad de la misma y, por tanto, también sobre la calidad de los derivados lácteos (Morand-Fehr et al., 2000). Con respecto a la proteína, los nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes consideran no solo la fracción de proteína de la dieta que se degrada en el rumen sino también la fracción de proteína que escapa a la degradación ruminal y llega al intestino delgado (ARC, 1980; NRC, 1985, 1989, 2001; INRA, 1988; AFRC, 1992; Madsen et al., 1995;). Desde la introducción de estos sistemas, se ha realizado una serie de estudios que pretenden

establecer el efecto de diferentes fuentes proteicas, en función de su composición y degradabilidad, sobre la producción láctea con objeto de optimizar la producción de proteína láctea (Christensen et al., 1993; Sahlu et al., 1993; Mishra y Rai, 1996 a,b; Sanz Sampelayo et al., 1998a; 1999).

De acuerdo con lo expuesto, se propuso la realización de un estudio en el que se analizara la composición y el aprovechamiento nutritivo de ciertas leguminosas grano (habas, yeros, altramuç y veza), así como de determinadas dietas en las que estas se incluyeran, con objeto de establecer su potencial de empleo para cabras en lactación.

Los objetivos planteados han sido los siguientes:

- Estimación de las características de la degradación en el rumen de la materia seca y de la proteína de las leguminosas grano objeto de estudio, así como de dietas diseñadas en base a ellas.
- Determinación para cada leguminosa, del perfil aminoacídico de la proteína y de su fracción no degradada en el rumen.
- Estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen, tanto de las distintas leguminosas como de las dietas experimentales.
- Estudio comparativo de las metodologías *in situ-in vitro* y solo *in vitro*.
- Establecimiento del valor nutritivo de las dietas experimentales que incluyen leguminosas grano en caprino en lactación.
- Estudio comparativo en caprino de la producción de leche, composición y calidad tecnológica de la misma, según las distintas dietas consumidas.



## **2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. LAS LEGUMINOSAS GRANO EN LA ALIMENTACIÓN ANIMAL

El conocimiento de los sistemas agrícolas primitivos y de los yacimientos arqueológicos indica que los granos secos de las leguminosas se utilizaban para obtener harinas destinadas al consumo humano. Eran de gran interés, tanto para cazadores-recolectores como para agricultores, principalmente por su alto contenido en proteínas. Normalmente, aparecían acompañando a cereales representativos de cada centro agrícola (Nadal Moyano et al., 2004a). En la Cuenca Mediterránea se pueden citar asociaciones como las del trigo o cebada con garbanzos o habas. En América del Sur, con el maíz y las judías (frijoles). En África, con el mijo o el sorgo y el caupí. La asociación cereal –leguminosa ha sido, por tanto, una constante en la agricultura.

En España, durante los años 50, se promovió el desarrollo de sistemas de ganadería intensivos y el empleo de los concentrados frente a los forrajes en la alimentación animal. Como constituyentes del concentrado de la dieta, se utilizaban diferentes fuentes proteicas suponiendo las leguminosas grano un 10% del consumo total de piensos concentrados en 1950 (Gonzalez-Carbajo et al., 1978), cantidad que descendió al 1%, aproximadamente, en 1976. Aunque en la alimentación animal fue tradicional el empleo de ciertas leguminosas grano como titarros (*Lathyrus sativus* y *Lathyrus cicera*), yeros (*Vicia ervilia*), vezas (*Vicia sativa*), alberjones (*Vicia norbonensis*), algarrobas (*Vicia monantos*), habas (*Vicia faba*), alhovas (*Trigonella foenumgraecum*), guisantes (*Pisum sativum*) etc., no pudieron competir con el precio de la proteína de la torta de soja, subproducto de la extracción del aceite de la soja. A la falta de competitividad también contribuyó la inexistencia, tanto de mejoras en las técnicas de cultivo como de nuevas variedades. Actualmente se está potenciando, de nuevo, su empleo dada la necesidad de diversificación de las fuentes de proteína para la alimentación animal, que se ha hecho más patente con la aparición de la encefalopatía espongiiforme bovina. Las leguminosas grano, por tanto, adquieren un gran potencial como fuentes de proteína autóctonas con consecuencias ambientales y económicas favorables.

En la Figura 1 se representa la producción de proteína procedente de leguminosas grano (toneladas) y los requerimientos proteicos del ganado caprino (toneladas) desde 1961 a 2005 (datos obtenidos a partir de la producción de leguminosas grano y del número de cabezas de ganado caprino en España desde 1961 a 2005. FAOSTAT, 2006).

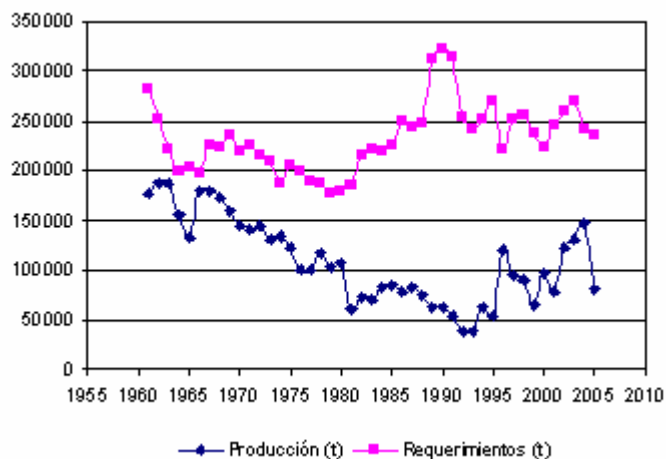


Figura 1. Producción de proteína de leguminosas (toneladas) y requerimientos proteicos de caprino (toneladas) en España.

Aun cuando no se han considerado a todos los rumiantes, se observa claramente que la proteína aportada por las leguminosas grano producidas en España no satisface los requerimientos proteicos del caprino, si no que se cubren utilizando, en mayor medida, harina de soja procedente de Estados Unidos. Se refleja la caída de la producción de leguminosas hasta 1994, en que se inicia un aumento progresivo, dadas las medidas adoptadas por la PAC tras la aparición de la encefalopatía espongiiforme. No obstante, la producción está todavía lejos de las alcanzadas años atrás. Se requiere, por tanto, un mayor impulso del empleo de las leguminosas grano en la alimentación animal.

Además de su importancia en la alimentación animal, las leguminosas grano presentan un gran interés en la alimentación humana. Recientemente se han demostrado los efectos beneficiosos potenciales que pueden llegar a ejercer ciertos factores no nutritivos presentes en las leguminosas. Entre ellos, hay evidencias del papel de los inhibidores de la tripsina, ácido fítico, saponinas y lectinas como factores reductores del riesgo de aparición de cáncer (Champ, 2002; Lajolo et al., 2004). Champ (2002), además, indica otros efectos, como la disminución de la glucosa en sangre debida al ácido fítico, lectinas, inhibidores de amilasa o compuestos polifenólicos y el efecto hipolipémico de saponinas, fitoesteroles, isoflavonas y ácido fítico. Con respecto al almidón y la fibra de las leguminosas grano, pueden emplearse en el procesado de alimentos y, además, se ha observado que pueden presentar efectos beneficiosos para la salud humana (Guillon y Champ, 2002).

### 2.1.1. Composición química de las leguminosas grano

Las leguminosas grano presentan un porcentaje de proteína, en relación a la materia seca, de entre 20 y 40% (Hadjipanayiotou et al., 1985; Boza 1991; Abreu y Bruno-Soares, 1998; González y Andrés, 2003) por lo que tienen un papel obvio en el balance de otros ingredientes de las dietas pobres en proteína. Contienen una baja cantidad de aminoácidos azufrados (metionina y cisteina) y de triptófano (Duranti y Gius, 1997;

Hadjipanayiotou y Economices, 2001) pero, son ricas en otros aminoácidos como la lisina. Por ello, son el complemento ideal de dietas basadas en cereales, ricos en aminoácidos azufrados y pobres en lisina (Nadal Moyano et al., 2004b). Según Duranti y Gius (1997), la mayor parte de las proteínas denominadas globulinas (legumina y vincilina) tienen función de almacén y son insolubles en agua pero solubles en soluciones salinas. La mayoría de las proteínas con actividad catalítica pertenecen al grupo de las albúminas, menos abundantes. Junto a estas, existen proteínas minoritarias, entre las que se incluyen los inhibidores de la tripsina, lectinas, lipoxigenasa y ureasa, que son de gran relevancia para la calidad nutricional de la semilla. Gatel (1994) destaca propiedades antigénicas en ciertas proteínas de las leguminosas grano, como las lectinas, legumina y vincilina, que inducen en el animal que las consume respuestas inmunes, locales o sistémicas.

Los carbohidratos constituyen aproximadamente un 50% del peso seco de las leguminosas grano, siendo una fracción nutritiva importante, puesto que por su elevada digestibilidad constituyen una fuente de energía en la dieta. Destaca el almidón, excepto en el altramuza, en el que solo representa cantidades traza, constituyentes de las paredes celulares y alfa-galactósidos (Wiseman y Cole, 1988). Los estudios sobre el comportamiento digestivo del almidón en las leguminosas grano, son escasos. Yu et al. (2002), en una revisión al respecto, presentan valores medios de degradabilidad ruminal para el almidón de 88, 80, y 73% en altramuza, habas y guisantes, respectivamente. El efecto del tratamiento con calor para reducir la degradabilidad de los carbohidratos, es mucho más dependiente del tipo de tratamiento y de las condiciones aplicadas durante el proceso, que en el caso de la proteína. Yu et al. (2000) encontraron que la aplicación de calor y presión o de calor seco en habas, produjo una disminución de la degradabilidad del almidón.

El contenido en grasa de las leguminosas grano es, en general, bajo (1-2%), aunque algunas, como el altramuza y el garbanzo, pueden alcanzar valores de hasta el 9% (Nadal Moyano, 2004b; González y Andrés, 2003). Los componentes fundamentales de la grasa son los ácidos oleico y linoleico, que constituyen 2/3 del total de los ácidos grasos presentes en las semillas de leguminosas.

Las leguminosas grano presentan un inconveniente importante debido a la presencia de compuestos no nutritivos, cuya función en la planta es de defensa frente a parásitos o plagas vegetales, pero que puede limitar su potencial como fuentes de nutrientes. Es probable que la sensibilidad del animal ante los factores no nutritivos esté influenciada por la especie y edad (Wiseman y Cole, 1988). El contenido en factores no nutritivos de las leguminosas europeas es generalmente bajo, pero podría ser lo suficientemente alto en ciertos cultivos, para llegar a reducir su valor nutritivo (Wiseman y Cole, 1988). Por otro lado, las leguminosas grano suelen incluirse como una fracción de la dieta, de modo que el efecto de los factores no nutritivos se vería reducido (Nadal Moyano, 2004b). Algunos de los factores no nutritivos son proteínas, como las lectinas y los inhibidores de proteasas, ampliamente distribuidos en las leguminosas grano. Sin

embargo, los más numerosos son compuestos fitoquímicos de bajo peso molecular, como polifenoles, taninos, fitatos, saponinas, y algunos oligosacáridos.

Los inhibidores de proteasas de mayor importancia son aquellos que actúan sobre la tripsina y la quimotripsina, reduciendo la disponibilidad de la proteína y la absorción de los aminoácidos desde el intestino delgado (Birk, 1989). Si se inactivan, pueden tener un papel nutricional positivo dado su elevado contenido en aminoácidos azufrados, en relación a la mayoría de las proteínas de la semilla (Ryan, 1990). Las lectinas son proteínas que pueden unirse a glicoproteínas y carbohidratos y tienen su efecto antinutritivo principal en el intestino delgado, interfiriendo con la absorción de los productos finales de la digestión, al unirse a células de la mucosa epitelial (Puztai, 1989).

La presencia de taninos en las leguminosas grano, principalmente localizados en la cascarilla, es de gran importancia nutritiva. Los taninos son compuestos polifenólicos, que pueden clasificarse en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están formados por un núcleo constituido por un glúcido, que presenta los grupos hidroxilo esterificados con ácidos fenólicos. Los taninos condensados, que son los mayoritarios, son polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles, unidos mediante enlaces entre carbonos. Pérez Maldonado y Norton (1996) exponen que los taninos condensados están presentes en las plantas en tres formas: libres, asociados a proteína y asociados a fibra, produciéndose un intercambio de las tres formas durante su digestión en el tracto digestivo. El contenido en taninos condensados totales de las leguminosas grano, puede alcanzar los 20g/kg (Jadhav et al., 1989). Se considera que los taninos tienen efectos beneficiosos y perjudiciales dependiendo de su naturaleza y de su concentración, así como de otros factores (especie animal, estado fisiológico del animal y composición de la dieta) (Makkar, 2003). En algunos estudios se ha observado que la especie caprina no es muy sensible a la presencia de taninos (Lee y Lee, 2002) en su dieta. Este aspecto podría deberse a la secreción de proteínas ricas en prolina en la saliva (Mehansho et al., 1987), sugiriendo Provenza y Malechek (1984) que la producción de estas proteínas es significativa en cabras.

Los efectos antinutritivos de los taninos están asociados con su habilidad para unirse a proteínas de la dieta, polímeros como celulosa, hemicelulosa y pectinas, y minerales, disminuyendo en consecuencia su digestión (McSweeney et al., 2001). También se ha observado que los taninos pueden influir sobre el crecimiento microbiano, pero los mecanismos implicados no son bien conocidos (McSweeney et al., 2001); así mismo, parece que ciertos microorganismos muestran más tolerancia que otros a la presencia de taninos. Se conoce que los taninos presentan mayor afinidad hacia ciertos polímeros, como el polietilenglicol (PEG) y la polivinil pirrolidona (PVP), que hacia las proteínas. Muchos estudios *in vitro* han demostrado una mejora de la digestibilidad de la proteína de diferentes leguminosas grano usando PVP y PEG (Laurena et al., 1984; Barroga et al., 1985; Sievwright y Shipe, 1986; Garrido et al., 1991). Se ha comprobado que la adición de polietilenglicol a dietas de cabras inhibe el efecto negativo sobre la

digestión del nitrógeno en el rumen, puesto que se une a los taninos condensados (Landau et al., 2002; 2003; Yañez Ruíz, 2004).

Recientemente, el interés de los taninos está incrementando dado su efecto potencial sobre la utilización de la proteína de la dieta por el rumiante, principalmente en forrajes, pero también en concentrados. Los complejos tanino-proteína son estables a pH de entre 3,5 y 8 (Jones y Mangan, 1977), pero se disocian al abandonar el rumen debido a los cambios de pH, cuyo valor sea inferior a 3,5 como en el abomaso o superior a 8 como en el duodeno (Mangan, 1988). Protegen a las proteínas de la degradación microbiana en el rumen (Aerts et al., 1999; Makkar, 2003) mediante la protección de la acción de las proteasas o, directamente, por inhibición de las proteasas, o por una combinación de ambas estrategias (Aerts et al., 1999). Como consecuencia de esta disminución de la degradación, aumentaría el flujo de nitrógeno desde el rumen, así como la absorción de los aminoácidos en el intestino delgado, mejorando la productividad del animal (leche, carne y lana) y reduciendo la producción de metano y la excreción de nitrógeno al medio (Aerts et al., 1999; Makkar, 2003). Por tanto, los taninos condensados podrían mejorar la disponibilidad de la proteína en dietas ricas en proteína degradable, que excedieran los requerimientos microbianos, reduciendo su desaminación en el rumen (Barry y Manley, 1984; Barry et al., 1986; Mangan, 1988; Perez-Maldonado y Norton, 1996; McNeill et al., 1998). Teniendo en cuenta esta característica, se han empleado diferentes taninos en distintas proporciones, en la dieta de los rumiantes. Martínez et al. (2004) observaron que el aporte de ácido tánico, en diferentes proporciones, a semillas de leguminosas molidas, disminuía la degradabilidad de la materia seca y de la proteína, tras la incubación en el rumen de ovejas segureñas. Este efecto fue consecuencia de una marcada disminución de la fracción rápidamente degradable y de una menor velocidad de degradación, para todas las leguminosas y dosis empleadas. Se observó un efecto dependiente de la dosis, siendo éste significativo con la mayor concentración de ácido tánico en comparación con las muestras no tratadas. El efecto dosis-dependiente se ha comprobado en otros estudios (Aerts et al., 1999; Barry y McNabb, 1999; Hervás et al., 2001), de modo que concentraciones moderadas de taninos condensados (2-4,5 % en base a materia seca) pueden ejercer efectos beneficiosos sobre el metabolismo proteico en rumiantes, mientras que altas concentraciones en la dieta (>5,5% de materia seca) pueden disminuir la ingesta voluntaria de alimento, la eficiencia digestiva y la productividad del animal. Sin embargo, los efectos no son los mismos para todos los taninos condensados, si no que dependen de su estructura química (Min et al., 2003). Pero el interés práctico de los taninos está, más que en su empleo como suplemento de la dieta, en la modificación de su expresión génica en las leguminosas (selección de variedades de leguminosas ricas en taninos). También se ha comprobado que los taninos condensados presentes en la dieta pueden contribuir a la mejora de la salud animal, puesto que reducen los efectos de los parásitos intestinales y el riesgo de hinchado del rumen (Aerts et al., 1999).

### 2.1.2 Valor nutritivo de las leguminosas grano

Los estudios sobre el valor nutritivo de leguminosas grano de la región mediterránea son escasos. Se puede destacar el trabajo de Wiseman y Cole (1988) con cerdos, de Castanon y Perez-Lanzac (1990) con gallinas ponedoras, y de Hadjipanayiotou et al., (1985) con ovejas, que apuntan la posibilidad del uso de estos granos para dietas en animales, aunque en cantidades limitadas.

Con objeto de mejorar el valor nutritivo de las leguminosas grano se están empleando los últimos avances en genética molecular para desarrollar nuevas variedades. Tabe et al. (1993) destacan que, a nivel genético, deben considerarse tres puntos para la mejora de la calidad de las proteínas de las leguminosas: la regulación de la expresión genética, la incorporación de genes externos y la modificación de genes que codifiquen determinadas proteínas de almacenamiento. Por otro lado, se emplean varias técnicas de tratamiento térmico sobre las semillas, en las que el calor se aplica solo o en combinación con otros procedimientos (Goelema et al., 1998), como se expondrá en apartados posteriores de esta memoria. Estas técnicas son viables, seguras para el medio ambiente y relativamente baratas, comparadas con otros métodos, y no suponen ningún peligro para la salud de los animales. También se emplea el tratamiento con formaldehído (Tewatia et al., 1995; Rodehutschord et al., 1999).

### **Monogástricos**

Los requerimientos proteicos para monogástricos se consideran en términos de aminoácidos esenciales y, concretamente, del balance relativo de estos aminoácidos. La utilización neta de la proteína de raciones basadas en leguminosas grano en monogástricos, está en torno al 65-70% en animales en crecimiento, mientras que los valores observados con proteínas de origen animal suelen superar el 90% (Rubio, 2002). Esto se debe principalmente a tres causas: la composición aminoacídica de la proteína de las leguminosas, su digestibilidad, y la presencia de sustancias no nutritivas (Gatel, 1994). Por ello, es deseable valorar el empleo de las leguminosas grano con otras fuentes proteicas o con aminoácidos purificados (Wiseman y Cole, 1988).

Se han realizado diferentes estudios acerca del empleo de leguminosas grano autóctonas en dietas para pollos, como alternativa a la torta de soja. Molina et al. (1983) estudiaron el valor energético y proteico de la semilla de altramuz blanco (*Lupinus albus* var. *multulupa*) frente a la torta de soja, en pollos en crecimiento. No encontraron diferencias significativas, derivadas de la inclusión del altramuz en la dieta, respecto al crecimiento. Sin embargo, el tratamiento de la semilla a 120°C durante 30 minutos, aumentó el crecimiento y la energía metabolizable. Posteriormente, Aguilera et al. (1984), estudiaron la capacidad de utilización de diversas leguminosas grano incluidas en dietas de pollos de carne así como el efecto del tratamiento térmico (120°C durante 30 minutos) y de la incorporación de lisina y metionina. La inclusión de las leguminosas



en la dieta redujo el crecimiento, el balance de N y la retención energética total, e incrementó la producción de calor y deposición de grasa. El tratamiento térmico de las semillas aumentó el contenido de energía metabolizable en las dietas que contenían veza y altramuza y la retención de nitrógeno en pollos alimentados con la dieta que contenía veza. La incorporación de lisina y metionina a las dietas, produjo un aumento de la ganancia de peso de los animales. La retención total de energía fue muy similar con las dietas sin suplementar y suplementadas a la de las dietas no suplementadas y se observó un aumento de la síntesis proteica respecto de la deposición de grasa.

Castanon y Pérez Lanzac (1990) estudiaron el efecto de la inclusión de habas, veza, altramuza y guisantes seleccionados en dietas para gallinas ponedoras. Concluyeron que el altramuza y los guisantes pueden competir con la soja en esas dietas, teniendo en cuenta la proporción en la que se incluye y los posibles efectos tóxicos asociados con los factores no nutritivos. Obtuvieron una relación negativa entre la concentración en la dieta de habas y veza y la ingesta y producción de huevos. Por otro lado, observaron que la inclusión de guisante y altramuza en cantidades de 300 y 200g/Kg, respectivamente no afectó la productividad. Sin embargo, la inclusión de la veza o de las otras tres leguminosas en grandes cantidades en la dieta provocaba la caída de la producción de huevos al final del experimento, lo que podía deberse a la acumulación de compuestos tóxicos en el organismo.

## **Rumiantes**

Para valorar el empleo de leguminosas grano en la alimentación de rumiantes, es necesario conocer las características de estas semillas como fuentes de proteína, su degradabilidad y digestibilidad, así como su efecto sobre la producción y composición de la leche. Por otro lado, puesto que uno de los factores más importantes que determinan la producción de leche es la ingesta, resulta clave la aceptabilidad de las leguminosas grano por el rumiante. En este sentido, Dixon y Hosking (1992) señalan que el altramuza y los guisantes son usualmente aceptados tanto por vacuno como por ovino. Por otro lado, D'Mello (1992) expone que, en general, la ingesta voluntaria de las leguminosas tiende a ser más elevada que la de cereales o pastos.

### *Degradabilidad ruminal de la proteína*

Los estudios de degradabilidad ruminal de leguminosas grano crudas son escasos, excepto para el altramuza y las habas. Los datos disponibles, la mayoría obtenidos a partir de la técnica *in situ*, reflejan gran variabilidad, que puede deberse a diferencias metodológicas (condiciones de los animales y su alimentación, molido de la muestra, tamaño de poro del saco empleado para la incubación de las muestras, velocidad de paso de la dieta a través del rumen, etc) (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992; Huntington y Givens, 1995). Los estudios sobre la degradabilidad ruminal de las

leguminosas grano con otras técnicas, son escasos. Ismartoyo (2001) determinó la pérdida de materia seca *in vitro*, de cuatro leguminosas grano, concluyendo que las semillas eran fácilmente degradables.

En general, la proteína de las leguminosas grano es altamente degradable, siendo el valor de la fracción rápidamente degradable elevado (González y Andrés, 2003). La proteína de las leguminosas grano es rica en albúminas y globulinas (85-100%) que son muy solubles y rápidamente degradables en el rumen (Van Straalen y Tamminga, 1990). Los distintos estudios relativos al altramuz grano (Aguilera et al., 1992; Aufrère et al., 2001; Rémond et al., 2003; González y Andrés, 2003) revelan que la degradabilidad efectiva de su proteína es elevada. Sin embargo, hay una gran variabilidad en los valores de los parámetros del perfil de degradación. González y Andrés (2003), en su revisión, encuentran valores de degradabilidad efectiva de la proteína de altramuz, en ovino y vacuno, muy variables (62,3 -95,4%). Estos mismos autores obtienen valores de degradabilidad efectiva de la proteína de habas, que oscilan entre 79 y 91,4%. En el caso de los yeros y de la veza los estudios sobre degradabilidad efectiva de la proteína no son tan numerosos. Los valores obtenidos oscilan en torno a 73 y 80,8 % para la veza y 69,3 y 80,4 % para los yeros (Aguilera et al., 1992; Guedes y Dias da Silva, 1996; González y Andrés, 2003).

#### *Digestibilidad in vivo*

Estudios realizados con habas, veza y yeros en dietas para cabras de raza granadina (Varela et al., 1961) demuestran la elevada digestibilidad de estos alimentos, con coeficientes de digestibilidad de la materia orgánica y proteína elevados (en torno al 80-86%). Hadjipanayiotou et al. (1985) estudiaron el empleo de cinco leguminosas grano (*Lathyrus ochrus*, *Vicia ervilia*, *Cicer arietinum*, *Vicia faba* y *Vicia sativa*) en la alimentación de ovejas, concluyendo que son buenas fuentes de proteína, de alta digestibilidad y alto contenido energético y que sus pajas son de mayor valor nutritivo que las de cereales. Sin embargo, estos autores apuntaron que se requerían más estudios antes de recomendar la inclusión de grandes cantidades de estos ingredientes en dietas para rumiantes. Posteriormente, Abreu y Bruno-Soares (1998) obtienen valores similares (entorno a 83,6 y 92,1) para los coeficientes de digestibilidad de la materia orgánica de una serie de leguminosas grano (*Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, *Vicia sativa*, *Vicia faba*, *Lathyrus ochrus*, *Lathyrus cícera*, *Lupinus angustifolius* y *Lupinus luteus*) en carneros. Estos autores observan que los componentes que mejor predicen la digestibilidad de la materia orgánica, fueron la proteína bruta, fibra ácido detergente y almidón.

*Tratamiento tecnológico de las leguminosas grano: influencia sobre su valor nutritivo*

Aunque las leguminosas grano son ricas en proteína, esta es altamente degradable en el rumen, lo que disminuye su calidad como suplemento proteico para la alimentación animal. Por ello, se emplean diferentes estrategias como el tratamiento con calor (Yu et al., 2002) o formaldehído (Antoniewicz et al., 1992), que reducen la degradación ruminal de la proteína, incrementando la cantidad de ésta que llega al intestino delgado, para su absorción y digestión. Además, el tratamiento con calor puede inactivar los compuestos no nutritivos presentes en las leguminosas grano (Liener, 1980, Van der Poel et al., 1991).

La digestión en el rumen de las fracciones potencialmente degradables del almidón y la proteína puede ser descrita por un modelo cinético de desaparición de este compartimento (Ørskov y McDonald, 1979), definido por dos actividades: la velocidad de degradación y el ritmo de paso a través del rumen. La modificación de ambas actividades, puede alterar la degradabilidad de proteínas y carbohidratos. Los tratamientos con calor modifican la velocidad de degradación en el rumen y con ello la proporción de almidón o proteína digerida en este u otros tramos posteriores del tracto digestivo. Esto puede suponer una incidencia importante en la eficiencia de utilización de la dieta y en la respuesta productiva del animal. El fundamento del empleo de estos procesos es que el calor favorece la reacción de Maillard entre los grupos aldehído de los azúcares y los grupos amino libre de la proteína, produciendo un complejo aminoazúcar que es más resistente que los péptidos normales a la hidrólisis enzimática. Si el tratamiento es lo suficientemente moderado, se puede reducir la degradación ruminal sin afectar, negativamente, a la digestibilidad intestinal. Por otro lado, la molienda podría aumentar el ritmo de degradación debido al aumento de la superficie expuesta a la acción bacteriana, pero también el menor tamaño de partícula disminuiría el tiempo de retención, compensando, en parte, la mayor velocidad de degradación. Kibelolaud et al. (1991) comprobaron que la molienda a diferentes tamaños de luz de malla influía sobre la degradabilidad del nitrógeno en el rumen de la semilla de altramuza, obteniendo unos valores de 93,0, 94,9 y 63 %, para un tamaño de muestra de 1, 1,5 y 5 mm respectivamente. El efecto de la interacción entre el tratamiento térmico y el procesado físico sobre la degradabilidad de la proteína, ha sido estudiado por Lykos y Varga (1995). Estos autores midieron el tamaño medio de partícula en habas de soja cruda y tostada, que habían sido sometidas a molienda grosera o fina. Independientemente del tipo de molienda, el tostado supuso una reducción mayor del tamaño de partícula medio de las semillas, respecto al de las habas crudas. Aunque el tratamiento térmico redujo la degradabilidad de la proteína para ambos tipos de molienda, las diferencias por efecto del tostado sólo fueron significativas cuando las habas se suministraron finamente molidas.

Los tratamientos térmicos para el procesado de alimentos, en los que se emplean elevada temperatura, presión y humedad (extrusión y expansión), o tratamientos en seco

(tostado y abrasado), mejoran la digestibilidad del almidón y reducen la solubilidad y degradabilidad de las proteínas (Goelma, 1999). Durante el proceso de extrusión, el tiempo de procesado varía de 30 a 50 segundos y la temperatura de 80 a 200°C. En la expansión, el tiempo varía de 5 a 15 segundos y la temperatura de 80 a 140 °C. En el tostado, el tiempo y la temperatura pueden ser muy variables, aunque existe otra modalidad (abrasado) que es más agresiva puesto que la temperatura puede llegar a alcanzar los 200°C. Las diferencias en las temperaturas y el tiempo de calentamiento, condicionan el resultado obtenido desde la subprotección hasta el quemado.

La información bibliográfica disponible refleja que el tratamiento más utilizado para la mejora del valor proteico de las leguminosas ha sido la extrusión. Este proceso en el altramuz grano puede disminuir la degradabilidad de la proteína y aumentar la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (Cros et al. 1992a; Kibelolaud et al., 1993; Benchaar et al., 1994; Rémond et al., 2003;). Estudios recientes de Solanas et al. (2005) han mostrado que la extrusión reduce claramente la degradabilidad ruminal de la proteína de altramuz, garbanzo y soja, siendo la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen de las leguminosas tratadas significativamente superior que la que presentaban las semillas crudas. Se han observado efectos similares de la extrusión sobre habas (Cros et al., 1992b) y guisantes (Walhain et al., 1992). Masoero et al. (2005) emplearon el tratamiento por extrusión con habas, altramuz y guisantes; a estos últimos, también se les aplicó la expansión y el tostado. Observaron que el tratamiento del guisante mediante extrusión provocó la disminución de la degradación de la proteína *in vitro*, en mayor medida que la expansión y el tostado. La reducción de la degradabilidad de la proteína *in vitro* de las habas mediante extrusión fue del 37%, mientras que la del altramuz solo sufrió una disminución moderada.

Según Goelma et al. (1998) el tostado con presión durante 3 minutos a 132°C disminuyó la degradabilidad ruminal de la proteína de guisantes, habas y altramuz, así como la del almidón de los guisantes y las habas, en particular cuando las semillas se trituraban frente a las semillas enteras, sin afectar seriamente a la digestibilidad total de la proteína. Yu et al. (2002) ensayaron el tostado con presión y observaron que incrementaba significativamente la fracción de proteína no degradable en rumen de altramuz, habas, guisantes y soja, incrementando el aporte de proteína al intestino delgado. En cuanto a estudios de tratamiento con temperaturas más elevadas (abrasado) en altramuz, Robinson y McNiven (1993) y Murphy y McNiven (1994) observaron un descenso en la fracción soluble de la proteína y una reducción en la tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable en rumen.

Aguilera et al. (1992) estudiaron el efecto del autoclavado a 120°C durante 30 minutos, sobre la degradabilidad de varias leguminosas grano. Como resultado, se produjo un descenso importante en la degradabilidad efectiva de las semillas de guisante y altramuz y, moderado, en el caso de los yeros, mientras que la degradabilidad ruminal de la veza no se vió afectada. Por tanto, estos autores concluyen que la

susceptibilidad del tratamiento con calor de la proteína en las leguminosas grano variaba ampliamente, indicando que la extrapolación de unas leguminosas a otras podría llevar a errores.

Con respecto al efecto de los tratamientos térmicos sobre los factores no nutritivos de las leguminosas grano, Van der Poel et al. (1991) aplicaron reconstitución (humedad y almacenamiento de las semillas en anaerobiosis durante varios días), extrusión y reconstitución seguida de extrusión a habas (*Vicia faba* L.), observando un descenso del nivel de taninos de aproximadamente 50% con todos los tratamientos. Además, obtuvieron un aumento de la digestibilidad *in vitro* de la proteína de las habas mediante la extrusión. Alonso et al. (2000) comprueban que el descascarillado es el tratamiento más efectivo para la reducción de los niveles de taninos condensados y polifenoles, en *Vicia faba* y *Phaseolus vulgaris*. Estos autores concluyeron que la extrusión fue el tratamiento más efectivo para la eliminación de otros factores no nutritivos y la mejora de la digestibilidad de la proteína y del almidón, en comparación con el descascarillado, la incubación en agua o la germinación. Un estudio posterior de Abd El-Hady y Habiba (2003) concluye que el procesamiento mediante extrusión, previo remojo de las semillas durante 16 horas, mejoraba el valor nutritivo de una serie de leguminosas grano (*Vicia faba*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum* y *Cicer arietinum*) puesto que disminuía los factores no nutritivos presentes y aumentaba la digestibilidad de la proteína.

La información con respecto al empleo del formaldehído en leguminosas grano es escasa. Tewatia et al. (1995) y Rodehutschord et al. (1999), emplearon niveles bajos de formaldehído (0,54 y 0,4 g/100g de proteína, respectivamente para habas y altramuz). Tewatia et al. (1995) no observaron mejoras debidas al empleo de habas tratadas, en cuanto a producción y composición de la leche y digestibilidad de los nutrientes en cabras. Rodehutschord et al. (1999) no observaron cambios en la degradabilidad potencial de la materia seca y proteína del altramuz sin tratar o tratado en ovejas aunque la velocidad de degradación, sobre todo para la proteína, disminuyó en la semilla tratada. En cambio, otros autores emplean niveles más elevados de formaldehído para el tratamiento del altramuz (1-4 g/100g de proteína, Antoniewicz et al., 1992) y la harina de soja (0,6-1,8 g/100g de proteína, Crooker et al., 1986), observando una marcada disminución de la degradabilidad *in situ* con el nivel más bajo de formaldehído, y solo pequeños cambios debidos al aumento de la concentración de formaldehído.

### *Ingesta y producción de leche*

Dado que la leche de cabra se destina, casi por completo, a la producción de queso, resulta necesario evaluar las leguminosas grano no solo por su calidad nutritiva, sino también por su efecto sobre la calidad tecnológica de la leche. Cambios en la proporción de proteína y grasa de la leche, mediados por la alimentación, pueden provocar cambios en los derivados lácteos.

Existen numerosos estudios acerca del efecto de dietas que incluyen altramuz en vacas sobre la producción y composición de la leche (Guillaume et al, 1987; May et al., 1993; Robinson y McNiven, 1993; Singh et al., 1995, Bayourthe et al., 1998, Froidmont y Bartiaux-Thill, 2004), mientras que la información referente al el empleo de otras leguminosas en la alimentación de rumiantes (veza y yeros) es limitada (Haddad, 2006). El altramuz tiene un contenido en proteína bruta de 35-40% que lo hace una alternativa potencial a la harina de soja. Estos estudios, que emplean siempre harina de soja como fuente de proteína en la dieta control, proporcionan resultados muy diversos dado que consideran distintos niveles de leguminosa en el concentrado, distinta relación forraje:concentrado y semilla completa o molida, cruda o tratada. No obstante los resultados sugieren que la sustitución de harina de soja por altramuz crudo molido, resultaría en una producción de leche igual o menor que con la harina de soja. En relación a los efectos de las dietas que incluyan altramuz sobre la composición en ácidos grasos de la leche producida por vacuno, diferentes estudios (Robinson y McNiven, 1993; Singh et al., 1995; Froidmont y Bartiaux-Thill, 2004) obtienen alta proporción de ácidos grasos de cadena larga en la leche, que podría tener influencia en los productos derivados de esta.

Guillaume et al. (1987), observaron el efecto de la inclusión de altramuz molido frente a soja, en dietas isonitrogenadas para vacas en lactación. Aquellos animales alimentados con altramuz, consumían menos materia seca y producían menos leche, con menor porcentaje de proteína, que las vacas suplementadas con harina de soja. Estudios posteriores de May et al. (1993) demostraron que vacas alimentadas con dietas que incluían un 75% de la proteína procedente del altramuz, en comparación con aquellas cuya dieta incluía harina de soja, presentaban ingestas de materia seca similares y cantidades iguales de leche producida y de proteína en la leche. También observaron mayor producción de leche en animales alimentados con dietas en las que el altramuz estaba molido de manera grosera frente a aquellas en los que la semilla se incluía entera.

Robinson y McNiven (1993) estudiaron la suplementación con altramuz molido groseramente, crudo y tratado a 115°C frente a la harina de soja. Observaron que, pese a una menor ingesta de materia seca en las vacas alimentadas con ambos tipos de altramuz, la producción de leche y sus componentes fueron similares en vacas alimentadas con las tres fuentes proteicas, aunque la cantidad de la proteína en la leche, en el caso de la suplementación con altramuz, fue menor. Sin embargo, la proporción de ácidos grasos hipocolesterolémicos aumentó en la leche de vacas alimentadas con altramuz, tanto crudo como tratado. Atribuyeron este efecto, en parte, a la transferencia de los ácidos grasos de la dieta C18:1 y C18:2 a la leche, efecto que se incrementó en el caso de la semilla tratada. Singh et al. (1995) y Froidmont y Bartiaux-Thill (2004) han descrito este último efecto en un estudio similar. Singh et al. (1995), también observaron que la ingesta de materia seca en vacas alimentadas con altramuz crudo o tratado a 105°C fue menor que en aquellas alimentadas con harina de soja y que no hubo diferencias en la producción de leche. Sin embargo, aquellos animales alimentados con

dietas que incluían altramuz tratado produjeron más leche, con mayor cantidad de grasa, proteína y lactosa. Bayourthe et al. (1998) demostraron que una dieta con altramuz grano al que se le aplicó extrusión a 195°C, como suplemento proteico frente a harina de soja, disminuyó la ingesta, incrementó la producción de leche y provocó un ligero descenso en el porcentaje de grasa de la misma y un descenso en el contenido en proteína de la leche.

Recientemente, Masucci et al. (2006) han estudiado el empleo del altramuz frente a harina de soja, en dietas isonitrogenadas para ovejas en lactación. Esta sustitución no dio lugar a diferencias significativas en cuanto a ingesta de materia seca, producción y características de la leche, ni en cuanto a sus propiedades de coagulado. La leche de ovejas alimentadas con la dieta que incluía altramuz, mostró un mayor nivel de ácidos grasos de cadena media en su composición, de particular interés en la salud de los consumidores, así como una menor cantidad de ácidos grasos de cadena larga C18:0, C18:1 y C18:2, al contrario que lo observado por Robinson y McNiven (1993), Singh et al. (1995) y Froidmont y Bartiaux-Thill (2004).

Con respecto a otras leguminosas, Purroy y Surra (1990) emplearon proteína de guisantes o habas, en dietas de corderos en crecimiento, para la sustitución parcial o total de la proteína de la torta de soja. Observaron resultados similares en cuanto a producción y calidad de la canal.

En cuanto a estudios de valoración nutritiva referentes a veza y yeros, la información disponible es escasa. Haddad (2005) comprueba que la sustitución parcial o total de la harina de soja por yeros en dietas para corderos en crecimiento, no afecta a la ingesta de nutrientes o al crecimiento de los animales.

En relación a la alimentación de cabras, Varela et al. (1960), concluyen que las habas son un alimento idóneo para la producción. Ensayaron, comparativamente dos leguminosas, habas y veza, en cabras de raza granadina, observando que era posible la sustitución de las habas por la veza, puesto que no se modificaba la cantidad de leche producida, ni el porcentaje en grasa. Sanz Sampelayo et al. (1999) estudiaron el empleo de las habas como fuente de proteína en piensos para cabras en lactación, observando un aumento significativo del contenido de proteína en la leche.

## 2.2. COMPOSICIÓN Y CALIDAD DE LA LECHE DE CABRA

La leche de cabra y sus productos derivados son de gran importancia en la nutrición humana. Haenlein (2004) resume los aspectos que actualmente centran el interés por la leche de cabra, en los siguientes: 1) la leche y el queso de cabra han sido de gran relevancia en la alimentación de las zonas rurales y desfavorecidas, siendo la fuente principal de proteína para su población; 2) las exigencias gastronómicas de los consumidores hacen que aumente la demanda de productos derivados de la cabra, especialmente queso y yogur, por lo que se requiere un mayor conocimiento de la

materia prima, en relación a los productos finales; 3) la mejora que el empleo de leche de cabra y derivados lácteos en individuos que padecen alergias y otros desordenes gastrointestinales, derivados del consumo de leche de vacuno, un sector de la población significativo en países desarrollados. Parece, por tanto, que la composición de la leche de cabra determina características beneficiosas especiales y propiedades demostradas para la nutrición y salud humana, junto con su valor general como alimento (Haenlein, 2004).

La composición química de la leche de cabra varía considerablemente en función del estado de lactación, tipo de alimentación, raza, características propias de cada animal, clima, etc. (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Puesto que la proteína, especialmente la caseína, y la grasa, tanto en cantidad como en cuanto a su perfil de ácidos grasos, adquieren gran importancia para la salud humana y en la transformación quesera, ambos aspectos se desarrollarán con mayor profundidad en este capítulo.

### 2.2.1 Composición de la leche. Aspectos comparativos entre las leches de cabra, vaca y oveja

La leche de cabra y oveja presenta un color blanco, comparado con la de vaca que es amarillento, dada la presencia de carotenos en esta última (Saini y Gill, 1991). La leche de cabra es de naturaleza alcalina, al contrario que la de vaca que es ligeramente ácida, siendo muy útil para individuos con problemas de acidez. Dicha alcalinidad se debe a su mayor contenido proteico y a la presencia de diferentes fosfatos (Saini y Gill, 1991).

La leche de oveja presenta mayor contenido de grasa, proteína, cenizas y sólidos totales que la de cabra (Hadjipanayiotou, 1995; Jandal, 1996; Sanz Sampelayo et al., 2003; Jung Hoon Lee, 2006), siendo los valores de esta última superiores a los de la leche de vaca (Hadjipanayiotou, 1995). En cuanto al nitrógeno no proteico (NNP), Hadjipanayiotou (1995) observó que la leche que presenta mayor cantidad (en gramos por kilogramo de leche producida) es la de cabra (2,91 g/kg), seguida de la de oveja (2,7 g/kg) y vaca (2,18 g/kg). Sin embargo, el NNP como porcentaje de la proteína bruta, fue similar en la leche de cabra y vaca (7,13 y 7,43 % respectivamente) mientras que la de oveja presentó el valor más bajo (4,66 %). Por otro lado, Morand-Fehr et al. (1982) obtienen un porcentaje de NNP mayor en la leche de cabra (9-9%) que en la de vaca (5%). Estas diferencias, entre la leche de vaca, oveja y cabra influyen en el proceso de su transformación en queso y en las características de este.

Con respecto a la composición aminoacídica, la leche de cabra presenta valores superiores a los de la de vaca, en relación a seis de los diez aminoácidos esenciales (treonina, isoleucina, lisina, cisteína, tirosina, valina; Posati y Orr, 1976).

La leche de cabra es deficiente en vitamina B12 y ácido fólico, comparada con la leche de vaca. La distribución de otras vitaminas y de Ca, Mg, Na, K, y P es similar en la leche de vaca y cabra (Chandan et al., 1992). Jandal (1996), en una revisión al



respecto, señala que la leche de cabra tiene un contenido mineral ligeramente superior a la de vaca, pero inferior al de la de oveja. Sin embargo, la leche de cabra presenta valores superiores de calcio (194 mg/ 100 g) y fósforo (270 mg/ 100g) (Posati y Orr, 1976) a los de la de oveja (160 y 145 mg/100 g para calcio y fósforo, respectivamente) (Saini y Gill, 1991).

El carbohidrato mayoritario de la leche de cabra es la lactosa, cuyo porcentaje (4,08-4,45) es similar al de la leche de vaca (4,66-4,78%) (Chandan et al., 1992; Jandal, 1996) pero ligeramente superior al de oveja (3,7%) (Jandal, 1996).

### 2.2.2. Composición y características de la proteína

Las proteínas de la leche de cabra son similares a las más importantes de la leche de vaca, en cuanto a su clasificación general:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\kappa$ -caseínas,  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina. Sin embargo, son diferentes en cuanto a polimorfismos genéticos y su frecuencia en la población de cabras (Martín, 1993). Las caseínas representan la fracción proteica mayoritaria de la leche de cabra y se definen como un grupo heterogéneo de fosfoproteínas, que precipitan a partir de la leche descremada a pH 4,6 y a 20°C (Thompson et al., 1965).

El complejo caseínico tiene cuatro componentes principales, que son cadenas polipeptídicas, denominadas  $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ -, y  $\kappa$ -caseínas (esta última, en ocasiones, también glicosilada). En cuanto al polimorfismo genético, la  $\beta$ -caseína presentaría 4 alelos, y tanto la  $\alpha$ -s2- como la  $\kappa$ -caseína, presentarían dos variantes. La  $\alpha_{s1}$ -caseína se distingue por un fuerte polimorfismo estructural, asociado a una variabilidad alélica cuantitativa. A principios de los años 80, se identificaron siete variantes genéticas de la  $\alpha_{s1}$ -caseína (Boulanger et al., 1984). Posteriormente, se observó que las variantes genéticas podrían agruparse en categorías según el nivel de síntesis de la  $\alpha_{s1}$ -caseína en la leche de cabra (Grosclaude et al. 1987). Grosclaude et al. (1987) concluyeron que las variantes A, B y C se acompañan de una producción alta de  $\alpha_{s1}$ -caseína (aproximadamente 3,6g/l); el alelo E, asociado a un nivel medio, (aproximadamente 1,6 g/l); los alelos D y F, asociados a un nivel bajo de síntesis (aproximadamente 0,6 g/l) y el alelo O, que confiere el fenotipo nulo. Estos autores sugieren que cada variante individual tiene una función aditiva en la síntesis de  $\alpha_{s1}$ -caseína. La combinación F/F tendría una producción significativamente menor de  $\alpha_{s1}$ -caseína que la E/F, y ambas producirían significativamente menos cantidad que las combinaciones A/F y A/E (Grosclaude et al., 1987). A finales de los años 90, se identificaron nuevas variantes genéticas adicionales de la  $\alpha_{s1}$ -caseína (Martín y Addeo, 1996) como la G, que al igual que las D y F, está asociada con una baja producción de  $\alpha_{s1}$ -caseína. Además, se observó que la variante B, presentaba tres formas diferentes: B1, B2 y B3, asociadas con una síntesis relativamente elevada de la  $\alpha_{s1}$ -caseína. En razas caprinas italianas se han descrito cuatro nuevas variantes: C<sup>1</sup>, A<sup>1</sup>, X y W (Chianese et al., 1995) y en razas africanas se ha identificado la variante H (Pépin, 1995). Estas diferencias en los tipos genéticos, se deben a

sustituciones o deleciones de aminoácidos en las cadenas de proteínas (Trujillo et al., 1997).

Con respecto a la fracción caseína, la leche de cabra es rica en  $\beta$ -caseína y pobre en  $\alpha_{s1}$ -caseína, mientras que en la leche de vaca, la  $\alpha_{s1}$ -caseína es mayoritaria (Chandan et al., 1992; Trujillo et al., 1997). La leche de cabra contiene niveles relativamente mayores de  $\alpha_{s2}$ -caseína, en comparación con la de vaca, aunque la suma de las fracciones,  $\alpha_{s1}$ - más  $\alpha_{s2}$ -caseína, en la leche de cabra es menor que la fracción de  $\alpha_{s1}$ -caseína de la de vaca (Chandan, 1992). La proporción de las distintas fracciones caseínicas ( $\alpha_{s1}$ ,  $\alpha_{s2}$ ,  $\beta$ , y  $\kappa$ ), particularmente el contenido en  $\alpha_{s1}$ , afecta a las propiedades de coagulación de la leche y a la producción de queso (Ambrosoli et al., 1988; Remeuf et al., 1987, 1993; Vassal et al., 1994), así como a sus características (Grosclaude et al., 1994).

Las caseínas se organizan en la leche en forma de micelas, asociadas a un complejo mineral, compuesto de fosfato cálcico. Las micelas de caseína caprina presentan un grado de dispersión y un diámetro medio mayores, una mineralización más elevada, un nivel de hidratación inferior y son menos estables a los tratamientos térmicos, con respecto a las micelas de la leche de bovino (Trujillo et al., 1997). Estos parámetros pueden variar de forma más o menos acusada dependiendo de la variante de la  $\alpha$ -s1 caseína presente (Remeuf, 1993; Pierre et al., 1995).

Las principales proteínas séricas de la leche caprina son  $\alpha$ -lactalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina; la fracción minoritaria está constituida por seroalbúmina, proteosas, peptonas e inmunoglobulinas (Jennes, 1979).

En cuanto a la composición de la leche de cabra en función del genotipo, Clark y Sherbon (2000) observaron que la leche de cabras, con al menos un tipo de la variante genética de alta producción de  $\alpha$ -s1 caseína (A, B1, B2, B3 o C), contenía un mayor porcentaje de sólidos totales, sólidos no grasos, proteína y  $\alpha$ -s1 caseína que aquellas que presentaban solo variantes de baja producción de  $\alpha_{s1}$ -caseína (D, F o G) o eran homocigóticas para la variante nula. Estos autores no encontraron diferencias significativas en cuanto a la coagulación de la leche procedente de cabras con diferentes variantes genéticas para la  $\alpha_{s1}$ -caseína. Sin embargo, observaron tendencias notables en este sentido: la leche que contenía al menos una variante de tipo alto tendía a presentar mejores propiedades de coagulación que la leche procedente de cabras homocigotas para el alelo O. Recientemente, De la Torre (2006) obtiene que tanto el rendimiento quesero como la firmeza de la cuajada resultaron mayores con el empleo de leche procedente de cabras de alta capacidad de síntesis de  $\alpha_{s1}$ -caseína frente a animales de baja capacidad.

Quiles et al. (1994) estudiaron la evolución, durante la lactación, del contenido en proteína total, caseínas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) y proteínas del suero ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina) en la leche de 44 cabras de raza murciano-granadina y obtuvieron unos valores medios de 40,9, 32,1 y 8,7 g/l, respectivamente. Dentro de estos grupos las

cantidades obtenidas para  $\alpha$ -,  $\beta$ -, y  $\kappa$ - caseínas, así como para  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbúmina y proteínas minoritarias del suero (seroalbúmina, inmunoglobulinas y las proteosomas y peptonas) fueron de 8,5, 21, 2,5, 5,8, 1,5 y 1,4 g/l, respectivamente. Observaron que todas las proteínas y fracciones aumentaron significativamente durante la lactación, excepto las proteínas minoritarias del suero, que disminuyeron. Díaz et al. (1999) observaron que el contenido en proteínas y caseínas totales de la leche de cabras de raza murciano-granadina, variaba a lo largo de la lactación en una magnitud que dependía de la estación de la paridera, observándose una mayor variación en la paridera de primavera. Dicha variación fue mucho menor para el caso de las fracciones de  $\alpha$  y  $\kappa$  caseínas.

### 2.2.3. Composición de la grasa. Perfil en ácidos grasos

El porcentaje de grasa es el factor determinante de la cremosidad y del sabor de la leche de cabra y sus productos derivados (Morand-Fehr et al., 1999). El valor es superior en la leche de cabra (4,81) que en la de vaca (3,38), existiendo diferencias en cuanto a la estructura física y perfil en ácidos grasos (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). El tamaño medio de la micela o glóbulo graso de la leche de cabra es de 3,5  $\mu\text{m}$ , presentando un alto porcentaje de glóbulos con un tamaño de 1,5 a 3  $\mu\text{m}$ , considerablemente inferiores a los que presenta la leche de vaca (4,5  $\mu\text{m}$ ) (Stark, 1988; Chandan et al., 1992; Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

Una de las principales peculiaridades de la leche de cabra es su composición en ácidos grasos, que es diferente a la que presenta la leche de vaca (Haenlein, 2004) y la de oveja (Jung et al., 2005). La leche de cabra es rica en triglicéridos de cadena media (MCT), formados por ácidos grasos cuya cadena carbonada presenta de 6 a 10 átomos de carbono. La mayor proporción de los ácidos caproico (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), que pueden constituir del 15 al 18% en la leche de cabra, frente al 5-9% que presenta la de vaca (Boza y Sanz Sampelayo, 1997), confiere a la leche de cabra su sabor característico. Esta tiene mayor cantidad de ácidos monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA) y triglicéridos de cadena media (MCT) en comparación con la leche de vaca y oveja (Haenlein, 2004; Jung et al., 2006). La leche de cabra presenta, por tanto, valores muchos más altos de los ácidos butírico (C4:0), caproico (C6:0), caprílico (C8:0), caprico (C10:0), laurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmítico (C16:0), que las de vaca y oveja. Sin embargo, la leche de vaca presenta valores más elevados de los ácidos esteárico (C18:0) y oleico (C18:1) (Haenlein, 2004), mientras que la de oveja contiene mayores niveles de ácidos grasos saturados de cadena larga, particularmente esteárico (18:0) y eicosanoico (20:0).

Alonso et al. (1999) estudiaron la composición en ácidos grasos de la leche de cinco rebaños de cabras en la región de Murcia. Observaron que los cinco ácidos grasos de mayor importancia, en términos cuantitativos (C16:0, C18:1, C10:0, C14:0 y C18:0) constituían más del 75% del total de los ácidos grasos de la leche, mientras que los valores medios de ácidos caprílico y caprico fueron de 2,7 y 9,9%, respectivamente.

Poveda y Cabezas (2006) obtienen resultados similares en quesos producidos a partir de leche de cabras de la región de La Mancha, concluyendo que estos cinco ácidos grasos mayoritarios constituían, aproximadamente, el 85% del total de ácidos grasos. Además, señalan que el ácido butírico era el principal ácido graso de cadena corta (5,6% del total de ácidos grasos), siendo el caprico el ácido graso de cadena media mayoritario (8,9% del total de ácidos grasos).

Con respecto a los ácidos grasos ramificados, Alonso et al. (1999) identificaron 36 en la leche de cabra. Los más importantes, en términos cuantitativos, fueron las formas iso- y anteiso- del C15 y anteiso-C17 e iso-C16. Estos ácidos grasos también son predominantes en la leche de vaca. Kim Ha y Lindsay (1993) determinaron la fracción de ácidos grasos volátiles en quesos y cuantificaron 5 ácidos grasos ramificados de menos de 10 átomos de carbono, no identificados anteriormente (Massart-Leen et al., 1981). Estos autores hicieron énfasis en la existencia de ácidos grasos ramificados monometilo, además de las formas iso y anteiso, principalmente sustituciones de grupos metil sobre ácidos grasos C4 y C6, presentes en la leche caprina pero no en la bovina. Identificaron y cuantificaron 25 ácidos grasos ramificados con un grupo metil, 2 ácidos grasos con grupo dimetil y 4 con grupo etil. Los ácidos 4 etiloctanoato (227 µg/g) y 4 metiloctanoato (391 µg/g) confieren el sabor característico a la leche y derivados lácteos de cabra y oveja. Aproximadamente del 5 al 15% de la cantidad total de C18:1 está en configuración trans, tanto en cabra (Alonso et al., 1999) como en vaca (Selner y Schultz, 1980) siendo el principal isómero el trans-vacénico (35-40%) para ambas (Bicherstaffe et al., 1972; Alonso et al. 1999). Con respecto al contenido en trans-C18:1 de la grasa de la leche de cabra, Alonso et al. (1999) obtuvieron un valor medio de 2,12%, menor que el estimado para la leche de vaca (3,8 %) por otros autores (Precht y Molkentin, 1996). Sin embargo, la proporción de los distintos isómeros del trans-C18:1 y el contenido de trans-C16:1 fue comparable en ambas especies (Alonso et al., 1999).

Jung et al. (2006) observaron que la leche de cabra presenta niveles más bajos de ciertos ácidos grasos monoinsaturados (C13:1n-9, C14:1n-5, C16:1 trans, C16:1n-7 y C18:1n-9) en comparación con la de oveja. En este estudio no se observaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de ácido C18:1 trans entre las leches de cabra y oveja. Sin embargo, otros autores demuestran que el nivel de los ácidos C18:1 trans es significativamente superior en la leche de oveja que en la de cabra (Griinari y Bauman, 1999). El nivel de ácido vacénico (C18:1 11-trans) en leche de oveja fue ligeramente superior al de la de cabra; no obstante, el contenido en ácidos grasos C18:1 trans, varía en función de la alimentación, periodo de lactación o raza. Con respecto a los ácidos grasos polinsaturados, no se observaron diferencias en cuanto a C18:2 cis-9, trans-11, linolenico (C18:3n-3) y docosapentaenoico (C22:5n-3). Sin embargo, los niveles de ácido linoleico (C18:2n-6), C18:2 trans-10, cis-12 y  $\gamma$ -linolenico (C18:3n-6) en leche de cabra fueron significativamente mas bajos que en leche de oveja. Actualmente, uno de los aspectos más estudiado con respecto a la leche y carne del rumiante, es la cantidad

en ácido linoleico conjugado (CLA), dadas las propiedades saludables que se le atribuyen. El término ácido linoleico conjugado, incluye una serie de isómeros, principalmente cis-9, trans-11 y trans-10, cis-12, del ácido linoleico, que es el cis-9, cis-12 octadecaenoico. Se considera que el ácido C18:2 cis-9, trans-11, es el mayoritario en la leche de rumiantes, denominándose también ácido ruménico. Griinari y Bauman (1999) concluyen que la leche de oveja presenta el mayor contenido de CLA y ácido vacénico, en comparación con la leche de cabra y vaca. El valor medio de ácido ruménico (cis-9, trans-11) en cabras está en torno a 0,4-0,9% del total de ácidos grasos (Alonso et al., 1999; Gulati et al., 2000; Chilliard et al., 2002).

#### 2.2.4. Aspectos saludables de la leche de cabra

##### **Ácidos grasos**

La leche de cabra presenta mayor digestibilidad que la de vaca, debido a ciertos aspectos relativos a la grasa: tamaño de los glóbulos de grasa y presencia de ácidos grasos de cadena corta y media. El menor tamaño de los glóbulos grasos de la leche de cabra proporciona una emulsión fina y más uniforme, que confiere mayor digestibilidad frente a la leche de vaca (Stark, 1988; Chandan et al., 1992; Jandal, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Por otro lado, esta característica hace que, desde el punto de vista tecnológico, la grasa sea más susceptible a la lipólisis y al desarrollo de aromas típicos, asociados con la presencia de ácidos grasos volátiles (Chandan et al., 1992). Además, la leche de cabra es rica en ácidos grasos de cadena corta y media (C4:0- C12:0), siendo su digestión más rápida puesto que las lipasas actúan más fácilmente sobre las uniones ester de estos ácidos grasos que sobre las que presentan los ácidos grasos de cadena larga (Jennes, 1980; Chandan et al., 1992). Los ácidos caprico, caprilico y caproico, presentan gran interés desde el punto de vista terapéutico, debido a su utilidad en determinadas enfermedades metabólicas, síndromes de malabsorción, hiperlipoproteinemia, malnutrición infantil, epilepsia, esteatorrea, fibrosis quística, etc. (García Unciti, 1996; Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Sanz Sampelayo et al., 2003; Haenlein, 2004). Estos ácidos grasos, dado su especial metabolismo, proporcionan energía en niños en crecimiento y tienen efectos hipocolesterolémicos en tejidos, a través de la inhibición de la formación de depósitos de colesterol (Park 1994; Haenlein, 2004).

Los ácidos grasos de la leche y sus productos derivados, que presentan un potencial anticarcinogénico o antiaterogénico, son el butírico, oleico, ácidos grasos poliinsaturados (especialmente los w-3) y el ácido linoleico conjugado (CLA) (Chilliard et al., 2000). Aquellos ácidos grasos de la dieta que presentan un efecto potencial negativo sobre la salud humana, asociados con el incremento de la frecuencia de padecer arteroesclerosis, enfermedades coronarias y cáncer, son los ácidos saturados, laurico (C12:0), mirístico (C14:0) y palmitico (C16:0), considerados hipocolesterolémicos (responsables de elevar la concentración de LDL colesterol)

(Murphy, 2001; Givens y Shingfield, 2004) y los ácidos grasos monoinsaturados trans o una parte de ellos (Chilliard et al., 2000).

El ácido butírico (C4:0) inhibe el crecimiento celular e induce a la diferenciación en un amplio espectro de líneas celulares cancerosas, incluyendo las del cáncer de mama y colon (Parodi, 1999; Murphy, 2001).

Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), tienen efectos positivos sobre las lipoproteínas plasmáticas humanas. El ácido oleico (C18:1) disminuye la cantidad de LDL colesterol sin afectar al HDL colesterol, resultando beneficioso puesto que existe una relación inversa entre HDL colesterol y la aparición de aterosclerosis (Murphy, 2001). Los ácidos grasos monoinsaturados, C18 trans, que aumentan el riesgo de enfermedades cardiovasculares, están presentes en menor proporción en la grasa de la leche de cabra (Alonso, 1999) que en la de vaca.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), cuyo consumo reduce el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, no se sintetizan en cantidades apreciables en los tejidos de los rumiantes y, por tanto, su concentración en leche es, esencialmente, un reflejo de la cantidad de estos que abandona el rumen (Givens y Shingfield, 2004). Por ello, una estrategia para el aumento de la cantidad de éstos en la leche de los rumiantes es la manipulación de su alimentación (Sanz Sampelayo et al., 2000; 2002), por ejemplo mediante el empleo de aceites ricos en ácido linoleico (C18:2 n-6) y linolénico (C18:3 n-3), y aceite de pescado como fuente de eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA), estos últimos con propiedades antiaterogénicas.

El CLA se ha asociado con importantes actividades biológicas, incluyendo la anticarcinogénica y aterogénica, la reducción de los efectos catabólicos de la estimulación inmune, la mejora del crecimiento, la disminución de la grasa corporal y la regulación de la glucosa en sangre (Murphy, 2001). La leche y sus derivados son la mayor fuente de CLA en la dieta humana, y el isómero cis-9, trans-11, el más abundante en los alimentos derivados de los rumiantes, habiéndose desarrollado una serie de estrategias nutricionales para maximizar su contenido en la leche (Chilliard et al., 2000).

La composición en ácidos grasos de la grasa de la leche de cabra puede modificarse mediante la alimentación como se expondrá en un apartado posterior de esta memoria, de manera que se incrementen los ácidos grasos de mayor interés para el consumo humano, disminuyendo aquellos más perjudiciales.

## **Proteína**

Los efectos cuantitativos, ligados al polimorfismo genético de la  $\alpha$ 1-caseína, además de repercutir en la calidad tecnológica de la leche de cabra, particularmente en su comportamiento frente a la coagulación, lo hacen en la calidad saludable de la misma (Sanz Sampelayo et al., 2003). En este sentido, la leche de cabras que presenten alta síntesis de  $\alpha$ 1-caseína, tendría la mejor calidad tecnológica, existiendo actualmente

programas de selección genética hacia este tipo de animales (Clark y Sherbon, 2000; Raynal-Ljutovac et al., 2005). También se ha observado que las cabras que contengan los alelos asociados con un nivel nulo o bajo de síntesis de la  $\alpha$ 1-caseína, presentarían mayor nivel de lipólisis que aquellas de variantes genéticas de alta producción (Raynal-Ljutovac et al., 2005). Con respecto a la calidad nutritiva, la leche procedente de cabras caracterizadas por una síntesis baja o nula de  $\alpha$ 1-caseína, tendría un tiempo de coagulación menor, por lo que formaría una cuajada más suave y de menor firmeza; esta sería más fácil de hidrolizar por las enzimas proteolíticas digestivas dando lugar a un mayor aprovechamiento digestivo de distintos nutrientes (Jennes, 1980; Chandan et al., 1992; Park, 1994; Sanz Sampelayo et al., 2003).

La alergia alimentaria más frecuente, especialmente en niños, es la debida al consumo de leche de vaca (Podleski, 1992). De acuerdo con Taylor (1986), la alergenicidad de la leche de vaca implica la respuesta de la IgE, siendo las caseínas y la  $\beta$ -lactoglobulina las más alergenas. La  $\beta$ -lactoglobulina es la proteína del suero mayoritaria en la leche de vaca, que no se encuentra en la leche humana, y es la principal responsable de la alergia a la leche de vaca (Park, 1994). Los síntomas normalmente se desarrollan entre la segunda y cuarta semanas de edad, y casi siempre dentro de los primeros seis meses de vida (Robertson et al., 1982). La sintomatología clínica que desarrollan los pacientes alérgicos a la proteína de la leche de vaca incluye: rinitis, diarrea, vómitos, asma, anafilaxis, urticaria, eczemas, catarro crónico, migrañas, colitis y dolores epigástricos. La leche de cabra se recomienda como alternativa a la de vaca en pacientes alérgicos (Rosenblum y Rosenblum, 1952; Walter, 1965; Van der Horst, 1976; Taitz y Armitage, 1984), a pesar de que algunas proteínas de la leche de cabra presentan inmunoreactividad cruzada con las de la leche de vaca (Park, 1994).

Existen muchas evidencias del carácter hipoalergénico de la leche de cabra en niños con alergia a la leche de vaca (Podleski, 1992). Sanz Sampelayo et al. (2003) y Haenlein (2004) señalan que el tratamiento con leche de cabra tuvo efectos positivos en el 40% de los niños alérgicos a la de vaca. Haenlein (2004) expone que en un estudio, 49 de los 55 niños que fueron tratados resultaron beneficiados del tratamiento con leche de cabra, haciendo también referencia en su revisión a una serie de estudios clínicos (Reinert y Fabre, 1997; Fabre, 1997; Grzesiak, 1997) en los que se observó que el 93% de los niños que presentaban alergia a la leche de vaca, respondían positivamente al consumo de leche de cabra. Se concluyó que esta presenta un gran interés para la nutrición infantil, dada su baja alergenicidad y mejor digestibilidad en comparación con la de la leche de vaca. Sin embargo, la información sobre la alergenicidad de la leche de cabra frente a la de vaca es escasa (Podleski, 1992; Sanz sampelayo et al., 2003), por lo que se requieren estudios basados en datos inmunológicos y mecanismos biológicos que apoyen las observaciones clínicas.

La mayoría de los humanos, sufren una pérdida gradual de la enzima intestinal lactasa desde de la infancia, y por tanto de su capacidad para digerir lactosa, el principal azúcar de la leche (Podleski, 1992); por tanto, los valores bajos de lactasa se asocian

con la intolerancia a la leche (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Como resultado de la ingestión de leche de vaca, los individuos que presentan intolerancia a la lactosa desarrollan distensión abdominal, dolores y diarreas. Esta sintomatología a menudo, se confunde con los síntomas comunes asociados a la alergia a la leche de vaca. En cuanto a la mayor tolerancia a la lactosa de la leche de cabra parece ser debida a su mayor digestibilidad frente a la de vaca; las tasas más adecuadas de liberación de nutrientes desde el estómago al intestino, optimizan la utilización digestiva de la lactosa (Boza y Sanz Sampelayo, 1997).

Destacan otras características de la leche de cabra, como su capacidad tampón, debido a las caseínas y fosfatos, de modo que puede ser empleada para el tratamiento de úlceras (Park, 1992). Por otro lado, la leche de cabra presenta mayor disponibilidad del hierro en ratas con anemia, que la leche de vaca (Park et al., 1986). En estudios con ratas que presentaban resección intestinal, simulando la condición patológica del síndrome de malabsorción, se encontró que la leche de cabra mejoraba la absorción intestinal de hierro y cobre (Barrionuevo et al., 2002), así como de la proteína y magnesio (López-Aliaga et al., 2003) y del calcio y fósforo (Campos et al., 2003).

### 2.3. VALOR PROTEICO DE ALIMENTOS PARA RUMIANTES EN LACTACIÓN

Es un hecho claramente demostrado que la alimentación del rumiante en lactación determina la producción y composición de la leche. Los primeros modelos nutricionales de alimentación proteica para rumiantes se basaban en el concepto de proteína bruta digestible (NRC, 1978; ARC, 1980). Sin embargo, este parámetro no permite el conocimiento de los procesos metabólicos que sufre la proteína durante la fermentación ruminal. Por ello, se han desarrollado sistemas más complejos, basados en la proteína verdadera disponible para la absorción en el intestino delgado, que son los denominados Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes (INRA, 1988; NRC, 1985, 1989, 2001; AFRC, 1992; Madsen et al., 1995). Estos sistemas consideran que los aminoácidos que alcanzan el intestino delgado de los rumiantes tienen tres orígenes: proteína de la dieta no degradada en el rumen, proteína microbiana, sintetizada en el rumen, y proteína de origen endógeno. La valoración de los alimentos para atender los requerimientos del rumiante, implica la determinación cuantitativa de estas tres fracciones, así como el estudio de su composición.

Puesto que la energía y la proteína son los factores que más limitan el crecimiento microbiano y la producción de leche en el rumiante (Clark et al, 1980, 1983), la manipulación de la dieta, puede dar lugar al incremento de la cantidad y mejora del perfil de aminoácidos que pasan desde el rumen al intestino delgado, de modo que se produzca una mejora de la producción de leche y de la proteína láctea. Es difícil establecer una relación energía:nitrógeno óptima en dietas de rumiantes dado que han de satisfacerse los requerimientos tanto de los microorganismos ruminales como del rumiante y, además, estos cambian con la situación fisiológica del animal



(mantenimiento, producción). La disponibilidad de aminoácidos para la producción de leche puede incrementarse aumentando la ingesta, optimizando la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano, y aportando aminoácidos de la dieta que escapen de la fermentación ruminal y pasen al intestino delgado, de modo que se complemente a la proteína microbiana (Clark et al., 1992).

### 2.3.1 Microbiota ruminal

Para conocer y poder manipular o dirigir los procesos que tienen lugar durante la fermentación ruminal, es necesario conocer los mecanismos de actuación de los microorganismos ruminales. En la microbiota ruminal se pueden distinguir varios tipos de microorganismos: bacterias, protozoos, hongos y arqueas, un grupo de bacterias descritas recientemente (Kamra, 2005), mayoritariamente anaerobios (Hungate, 1966), que desarrollan una actividad fermentativa de gran importancia en el rumiante puesto que están implicados en la hidrólisis enzimática de proteínas y polisacáridos vegetales. Las interacciones que se producen entre los distintos microorganismos del ecosistema ruminal son importantes para el mantenimiento de un equilibrio estable, de modo que la actividad fermentativa en el rumen sea óptima (Kamra, 2005). En animales domésticos, en los que las condiciones son menos variables, los cambios en la composición de la dieta y la forma física de la misma son, en gran parte, responsables de los cambios en la población microbiana (Mackie et al., 1978).

Las bacterias se encuentran en una concentración de  $10^9$ - $10^{10}$ /ml (Theodorou y France, 1993; McDonald et al., 1995), constituyendo la mayoría de la masa microbiana del rumen. Las bacterias pueden clasificarse según varios criterios, aunque normalmente se clasifican por el uso preferencial del sustrato como fuente de energía (Russell et al., 1992), pudiendo distinguirse entre celulolíticas, aquellas que degradan carbohidratos estructurales, y amilolíticas, las que utilizan carbohidratos no estructurales. Las bacterias celulolíticas, tienen requerimientos energéticos bajos, crecimiento lento, y utilizan amoníaco como fuente principal de N. Las bacterias amilolíticas presentan mayores requerimientos energéticos, crecimiento rápido, y utilizan mayoritariamente amonio, péptidos y aminoácidos como fuentes de N. Esta diferenciación, en cuanto a la cantidad de energía utilizada por los microorganismos ruminales para atender sus necesidades de mantenimiento y crecimiento, indica que la cantidad de proteína microbiana sintetizada o la eficiencia energética de dicho proceso varía con el tipo de sustrato fermentado y el ritmo de su degradación (Stern et al., 1994). Las bacterias celulolíticas son sensibles a cambios de pH, por lo que alimentos que produzcan caídas de pH pueden implicar la disminución de la digestión de los forrajes, mientras que las amilolíticas son tolerantes a pH bajos. También destaca otro grupo de microorganismos, las arqueobacterias (Woese, 1987; Kamra, 2005) presentes en el rumen en grandes cantidades ( $10^7$  a  $10^9$ /ml), dependiendo especialmente del contenido en fibra de la ración (Kamra, 2005). Las arqueas son metanogénicas, puesto que sintetizan metano a

partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> empleando la energía de la hidrólisis de los hidratos de carbono. Aunque la producción de metano represente una pérdida de energía (Kamra, 2005), es necesaria para evitar el acumulo de H<sub>2</sub> y el descenso excesivo del pH en el rumen.

Los protozoos están presentes en concentraciones de 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup>/ml (Theodorou y France, 1993; McDonald et al., 1995) y pueden constituir hasta el 40% de la biomasa microbiana (Theodorou y France, 1993; Russell y Rychlik, 2001) aunque contribuyen escasamente al flujo de proteína total al intestino delgado, aproximadamente el 11% (Shabi et al., 2000), debido a que son selectivamente retenidos en el rumen. Su característica principal es la habilidad para engullir grandes moléculas, carbohidratos, o incluso bacterias ruminales (Van Soest, 1994). Tienen una implicación directa en la digestión de la proteína y de los carbohidratos, puesto que son capaces de degradar carbohidratos no fibrosos y fibrosos (William y Withers, 1991) y las bacterias son su principal aporte de proteína. Intervienen en la regulación del reciclado del N bacteriano en el rumen, y aportan proteína soluble para el mantenimiento del crecimiento microbiano. Debido a que los protozoos no pueden utilizar N amoniacal (Onodera et al., 1977), una fracción de proteína insoluble, previamente engullida, es posteriormente retornada al fluido ruminal en forma de proteína soluble (Dijkstra, 1994).

Los hongos están en una concentración de 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup>/ml (Theodorou y France, 1993) y constituyen, aproximadamente, el 8% de la masa microbiana total del rumen (Orpin, 1984; Theodorou y France, 1993) y desempeñan un papel importante en la degradación de los componentes fibrosos de las plantas (Bauchop, 1979). El conocimiento que se tiene sobre los hongos es limitado, y su participación en la fermentación ruminal no está clara.

### 2.3.2. Degradación ruminal de la proteína

La actividad proteolítica combinada de protozoos, hongos y bacterias, junto con el sinergismo entre diferentes especies de estas últimas, resultan en una rápida degradación de la mayoría de los alimentos proteicos en el rumen. La degradación de la proteína es uno de los factores más importantes para establecer el valor proteico de un alimento en los rumiantes, puesto que determina el aporte de nitrógeno y ácidos grasos de cadena ramificada para el crecimiento de los microorganismos ruminales, así como el aporte de proteína no degradada al intestino delgado, fuente potencial para la absorción de aminoácidos (Hvelplund y Weisbjerg, 1998).

El proceso digestivo comienza con la unión de los microorganismos a las partículas del alimento (McAllister et al., 1994). La degradación de la proteína en el rumen se produce por la actividad proteolítica extracelular de los microorganismos, que da lugar a péptidos y aminoácidos que serán transportados al interior de las bacterias (Wallace R.J., 1996). Algunos autores han observado que la incorporación de los péptidos a la proteína microbiana era más efectiva que la de los aminoácidos (Wright, 1967; Copper y Ling, 1985). Estudios posteriores de Ling y Armstead (1995), con especies

bacterianas individuales, demostraron que ciertas bacterias (*Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*, *Fibrobacter succinogenes*, *Anaerovibrio lipolytica*) incorporaban preferentemente aminoácidos mientras que otras (*Prevotella ruminicola*, probablemente la más abundante) incorporan mayoritariamente péptidos. Carro y Miller (1999) estudiaron, en fermentadores de flujo semicontínuo (Rusitec), el efecto de la sustitución de  $\text{NH}_3$ , como fuente nitrogenada, por proteína, péptidos y aminoácidos, cuando se administraban una dieta compuesta por fibra. Estos autores observaron que se producía el incremento de la degradabilidad de la FND, FAD y celulosa, así como la producción de ácidos grasos volátiles, con el aporte de estas formas nitrogenadas distintas del  $\text{NH}_3$ . Estos resultados contradecían la asunción de que las bacterias celulolíticas solo emplean  $\text{NH}_3$ , como fuente de nitrógeno (Russel et al., 1992). En otro estudio, Carro et al., (1999) estudiaron el efecto de dos formas de nitrógeno (urea y caseína) sobre la fermentación de seis tipos de forrajes, concluyeron que se requieren formas nitrogenadas distintas del  $\text{NH}_3$  para la máxima digestión de la fibra, aunque la respuesta de los microorganismos ruminales sería dependiente de las características del sustrato susceptible de ser fermentado. Molina Alcaide et al., (1996) también observaron una mayor producción de ácidos grasos volátiles, aunque no un aumento de la degradabilidad de los carbohidratos, cuando sustituyeron urea por harina de pescado, para la suplementación de un arbusto (*Ulex parviflorus*) en la alimentación de fermentadores contínuo.

La actividad proteolítica principal de las bacterias es del tipo cisteína proteasa, seguida de los tipos serina proteasa y metaloproteasa, siendo de menor importancia la actividad ácido aspártico proteasa (Mackie y White, 1990). La actividad proteolítica de los protozoos, que es intracelular, es también del tipo cisteína proteasa, siendo significativa la actividad ácido aspártico proteasa (Forsberg et al., 1964). Por otro lado, los hongos como *Neocallimastix frontalis*, presentan actividad proteolítica extracelular del tipo metaloproteasa (Wallace, 1991). Los péptidos pueden ser degradados a aminoácidos por la acción de las peptidasas, e incorporados a la proteína microbiana o desaminados dando lugar a ácidos grasos volátiles,  $\text{CO}_2$  y amonio (Tamminga, 1979) (figura 2). El destino de los péptidos y aminoácidos absorbidos, una vez dentro de la célula microbiana, dependerá de la disponibilidad de energía (carbohidratos) (Bach et al., 2005). Si hay energía disponible, los aminoácidos serán transaminados y utilizados directamente para sintetizar proteína microbiana. Sin embargo, si la energía es limitante, los aminoácidos podrían ser desaminados y su esqueleto carbonado fermentado hasta ácidos grasos volátiles. Los ácidos grasos volátiles ramificados, isovalerato, 2-metilbutirato e isobutirato procedentes de la degradación de leucina, isoleucina y valina, respectivamente, son de gran importancia para el crecimiento de muchas bacterias ruminales, particularmente especies fibrolíticas (Bryan y Robinson, 1963). Cuando se produce un exceso de amonio en el rumen, este es absorbido, transportado al hígado y convertido en urea, que puede retornar al rumen vía saliva o ser excretada en la orina (figura 3). Brun-Bellut (1996) comprobó, en cabras, que el reciclado de la urea varía con el estado fisiológico, siendo mayor durante la lactación.

Bach et al. (2005), en una revisión al respecto, resumen los factores más importantes que afectan a la degradación de la proteína en el rumen en los siguientes: tipo de proteína (solubilidad y estructura), interacción con otros nutrientes (principalmente carbohidratos) y población microbiana predominante. El efecto del pH y/o el sustrato susceptible de ser fermentado y la interacción de este con otros nutrientes, así como el ritmo de paso del alimento a través del rumen, pueden afectar a la población microbiana predominante y modificar la degradación de la proteína.

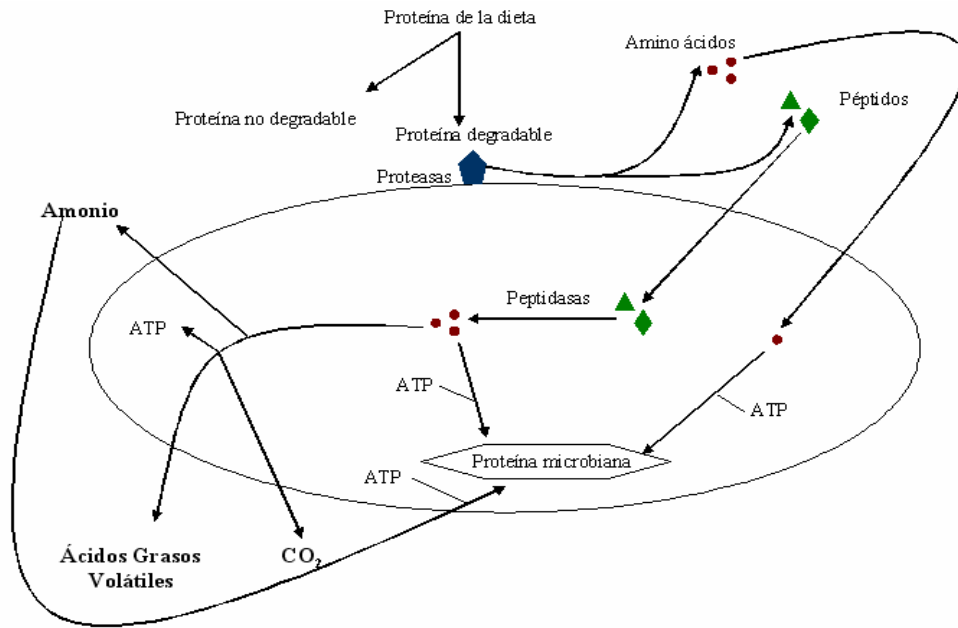


Figura 2. Degradación de la proteína en el rumen. Fuente: Bach et al. (2005).

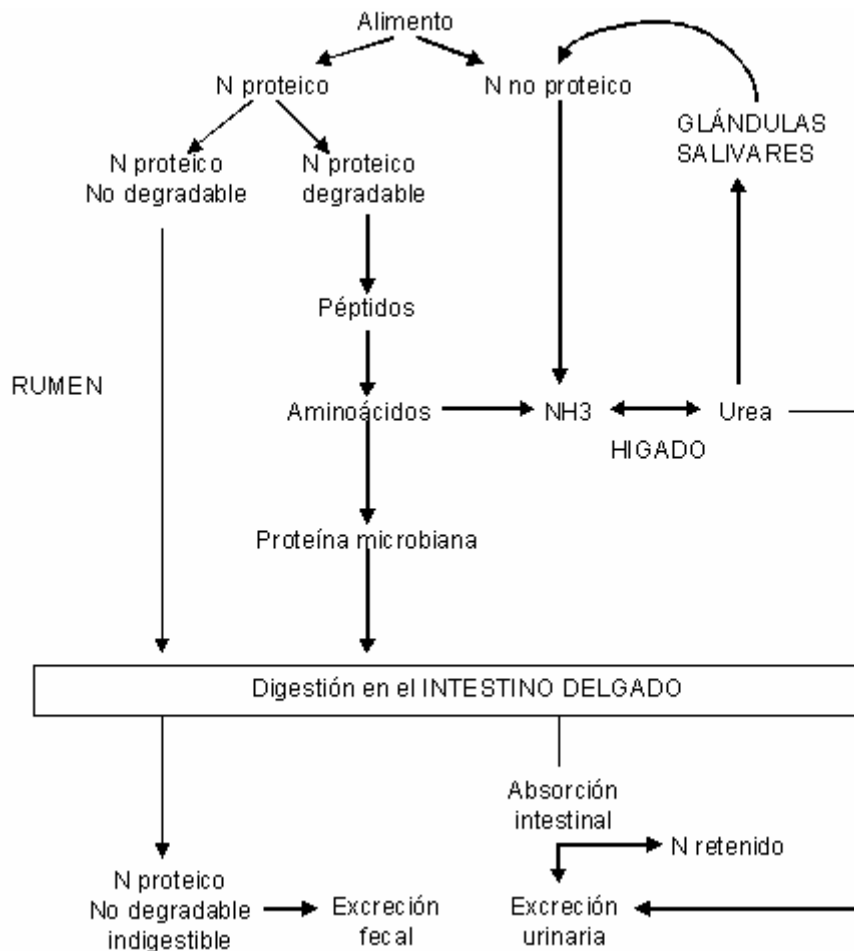


Figura 3. Digestión y metabolismo de los componentes nitrogenados en el rumen. Fuente: Adaptado de McDonald (1995).

La solubilidad de las proteínas y la estructura intrínseca de las mismas, determina su susceptibilidad a la acción de las proteasas microbianas (Mahadevan et al., 1980). Ciertas características como la presencia de puentes disulfuro, uniones específicas entre aminoácidos, dentro y entre cadenas de proteínas, determinan una mayor resistencia a la degradabilidad.

La degradación de la proteína está inversamente relacionada con su ritmo de paso a través del rumen (Ørskov y McDonald, 1979). Sin embargo, los cambios en la degradabilidad de la proteína producidos por variaciones en la tasa de paso a través del rumen son pequeños y afectan poco al flujo de proteína de la dieta no degradada en el rumen hacia el intestino delgado. El ritmo de paso del alimento a través del rumen, se ve a su vez influido por otros factores: el aumento de la ingesta (Tamminga, 1979) y el tamaño reducido de la partícula del alimento (Eliman y Ørskov, 1984), que aumentan el ritmo de paso repercutiendo negativamente sobre la degradabilidad.

Se ha comprobado que la disminución del pH, implica también la de la degradación de la proteína, tanto con dietas ricas en concentrado como con dietas ricas en forraje, en estudios con fermentadores continuos de flujo doble (Cardozo et al., 2000, 2002). A

pesar de que la actividad proteolítica ruminal es más alta en dietas ricas en concentrado que en aquellas en las que predomina el forraje, porque los microorganismos proteolíticos son mayoritariamente amilolíticos (France y Siddons, 1993), la disminución de la degradación de la proteína en los estudios de Cardozo et al. (2000, 2002) fue mayor cuando el sustrato de la fermentación microbiana procedía de la dieta rica en concentrado, sin tener en cuenta el pH. Este efecto también se ha observado empleando la técnica *in situ* (Devant et al., 2001). Se demuestra que la reducción de la degradación de la proteína no es solo efecto de la reducción del pH, sino que también está determinada por el tipo de sustrato fermentado, que induce el predominio de una u otra población microbiana. La interacción entre el sustrato susceptible de ser fermentado y otros nutrientes, también puede modificar el tipo de microorganismos predominantes en el rumen. Esto se comprueba en el caso de muchas proteínas vegetales, las cuales se encuentran en una matriz de fibra. En este tipo de estructuras, Endres y Stern (1993) observaron que la reducción del pH producía una reducción en el número de las bacterias celulolíticas por lo que la disminución en la degradación de la fibra, reducía el acceso de las bacterias proteolíticas a la proteína disminuyendo indirectamente, la degradación de la misma.

### **Metodologías para la estimación de la degradabilidad ruminal**

La estimación de la degradabilidad de la proteína *in vivo*, requiere animales provistos de cánula en el intestino proximal, con las complicaciones experimentales que esto conlleva. La estimación *in vivo* puede realizarse de dos formas distintas (Ørskov, 1992): el método diferencial, en el que el nitrógeno de la dieta que llega al intestino proximal se estima mediante la diferencia entre el nitrógeno no amoniacal y el bacteriano (que se identifica mediante marcadores), y el método de incremento de la concentración proteica, en el que se introduce el alimento objeto de estudio en una dieta isofermentable, en cantidad tal que no limite la síntesis microbiana, de modo que el incremento en el flujo de la proteína duodenal se atribuye, por completo, al alimento problema.

La degradabilidad ruminal de los alimentos puede determinarse *in situ*, mediante la técnica de los sacos de nylon (Ørskov y McDonald, 1979), que proporciona estimaciones adecuadas de la degradación *in vivo* (Madsen y Hvelplund, 1985). Esta técnica implica la introducción de sacos, que contienen una alícuota de alimento, en el rumen y la medida de la desaparición de los nutrientes a distintos intervalos de tiempo. Por tanto, la principal ventaja de este método es que proporciona condiciones del tracto digestivo, similares a las que existen *in vivo*. Actualmente, se emplea como método de referencia europeo el descrito por Madsen y Hvelplund (1994). Existen varios factores que producen variabilidad en la estimación de la degradabilidad mediante la técnica *in situ* (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992; Huntington y Givens, 1995): dimensiones del saco (área y tamaño de poro) así como su composición, preparación de la muestra

(desechado, tamaño de partícula), condiciones de la incubación de los sacos en el rumen (posición en el rumen, secuencia de incubación), tratamiento de los sacos tras la incubación ruminal (lavado y eliminación del material microbiano adherido), efecto de la composición de la dieta del animal, efecto del animal hospedador (diferencias entre especies, entre animales de la misma especie y debidas a las condiciones en un mismo animal). En el método *in sacco* se asume que la materia seca o nitrógeno que desaparece del saco tras la incubación en el rumen han sido degradadas. Se puede sobreestimar la degradabilidad de un alimento debido a la pérdida de partículas a través de los poros del saco, puesto que estas partículas se considerarían degradadas. Weisbjerg et al. (1990) sugirieron un método para cuantificar esa pérdida. Esta corrección puede tener un efecto marcado sobre la estimación del parámetro *a* (fracción de la materia seca o proteína rápidamente degradable) y un efecto variable sobre la degradabilidad efectiva de algunos alimentos (Prestloken, 1999).

Aunque la técnica *in situ* no sea la ideal, es rápida, reproducible y los requerimientos mecánicos son mínimos. Sin embargo los métodos *in situ* implican el uso de animales intervenidos quirúrgicamente para la implantación de una cánula ruminal, lo que conlleva un elevado costo de mantenimiento y dificultades adicionales para garantizar el bienestar animal. Por ello, se han desarrollado métodos *in vitro* que proporcionan estimaciones de la degradabilidad ruminal similares a las obtenidas con el método *in situ*. Estos métodos, revisados extensamente (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992; Stern et al., 1994, 1997; White y Ashes, 1999). Pueden clasificarse en: solubilidad en disoluciones tamponadas (Madsen y Hvelplund, 1985), métodos de simulación de la fermentación ruminal (Tilley y Terry, 1963; Hoover et al., 1976; Czerkawski y Breckenridge, 1977; Theodoru et al., 1991), métodos enzimáticos (Mahadevan et al. 1980; Assoumani et al., 1992; Antoniewicz y Kosmala, 1995; Kohn y Allen, 1995), técnicas de inhibición de la síntesis de proteína microbiana *in vitro* (Broderick, 1987; Hristov y Broderick, 1994) y fraccionamiento proteico (Sniffen et al., 1992).

Los métodos *in vitro* que simulan la fermentación ruminal, reducen el uso de animales canulados, y por consiguiente la variación animal, al mismo tiempo que reducen los costes y el tiempo. Los métodos más sencillos son los de Tilley y Terry (1963) y la técnica del gas, perfeccionada por Theodoru et al. (1991), en la que se mide el gas producido a partir de la fermentación anaerobia de los carbohidratos (ácidos grasos volátiles, CO<sub>2</sub>, metano y H<sub>2</sub>). Los métodos de simulación más complejos son los fermentadores, que permiten el estudio tanto de los factores que afectan a la ecología ruminal como de los que afectan a la digestión de los nutrientes. Los dos modelos más utilizados son el Rusitec (Rumen Simulation Technique), que es un sistema semi-continuo (Czerkawski y Breckenridge, 1977) y el de doble flujo continuo (Hoover et al., 1976). Su mayor limitación, frente a los métodos *in vivo*, es no poder simular procesos biológicos, como la cuantificación del nitrógeno endógeno (a excepción de la urea salivar), o la absorción ruminal. Además, sobre todo en los sistemas continuos,

sufren problemas de defaunación después de periodos de incubación relativamente cortos (Stern et al., 1997).

En el sistema Rusitec se simula el tiempo de permanencia del alimento en el rumen situando al alimento en bolsas de nylon, que serán suspendidas en los recipientes fermentación durante 48 horas. Prevot et al. (1994) evaluaron el sistema Rusitec, concluyendo que no reproducía las condiciones que se daban en los sistemas *in vivo*, por lo que, al igual que ocurría con la técnica *in situ*, es necesario estandarizar una serie de variables. Carro et al. (1995), comprobaron que el tamaño de poro de los sacos incubados influía no solo sobre la digestión de la materia seca y FND de la dieta, sino también sobre la población microbiana y, por tanto, sobre la fermentación. Con respecto a los sistemas de doble flujo continuo, Mansfield et al. (1995) los compararon con los sistemas *in vivo* y concluyeron que ambos sistemas fueron similares en el 80% de las medidas individuales realizadas, suponiendo un modelo adecuado para el estudio de la fermentación microbiana ruminal.

El empleo de enzimas proteolíticas presenta la ventaja de ser completamente independiente del animal, por lo que produce menor variación y su estandarización es más sencilla. Sin embargo, la interpretación biológica de los resultados es limitada, puesto que simula una actividad enzimática mucho más simple que la ruminal (Stern et al., 1997). Los métodos enzimáticos emplean proteasas que pueden proceder de extractos de enzimas microbianas ruminales (Kohn y Allen, 1995) u otro tipo de proteasas (Assoumani et al., 1992, que emplean proteasas procedentes de *Streptomyces griseus*). Mahadevan et al. (1987) concluyeron que el uso de enzimas que no proceden de extractos ruminales en un sistema *in vitro* para predecir la degradación de la proteína de la dieta, puede tener un valor limitado debido a que estas enzimas podrían no presentar la misma acción que las procedentes de extractos de líquido ruminal. Para permitir el acceso de las enzimas a los sustratos proteicos se sugiere la adición de  $\alpha$ -amilasa, en caso de alimentos que presenten un contenido de almidón igual o superior al 23% (Assoumani et al., 1992), y de enzimas fibrolíticas, cuando se estudie la digestión proteica de los forrajes (Abdelgadir et al., 1996). Los métodos enzimáticos, son adecuados para estudiar diferencias relativas entre alimentos, más que para proponer valores absolutos de degradabilidad (Nocek, 1988).

Broderick (1987) desarrolló un método en el que se inhibía la síntesis de proteína microbiana y, mediante la concentración de nitrógeno amoniacal, producto final de la degradación, se estimaba la degradación proteica. Este método producía la misma tasa de degradación de varios suplementos que la técnica *in situ*, pero el valor de degradabilidad era muy diferente (Broderick et al., 1988). Posteriormente, el método se ha ido perfeccionando con el uso de amoníaco marcado con  $N^{15}$  para corregir el valor de la degradabilidad por su incorporación a la proteína microbiana (Hristov y Broderick, 1994).



El sistema Cornell, desarrolla un método para la estimación de la degradabilidad de la proteína (Sniffen et al., 1992) basado en el fraccionamiento proteico. La estimación de la degradación de la proteína se correlaciona altamente con los valores del NRC (1989). Sin embargo, esta metodología requiere una mayor validación (Stern et al., 1997).

### 2.3.3. Síntesis de proteína microbiana

Puesto que los microorganismos ruminales proporcionan proteína de alta calidad al rumiante en lactación y que la tasa de crecimiento microbiano afecta a la disponibilidad de aminoácidos, puesto que la mayor parte de aminoácidos que alcanzan el intestino delgado provienen de proteína microbiana, es importante maximizar la síntesis de proteína microbiana en el rumen. Parte de la proteína microbiana sintetizada en el rumen no llega al intestino delgado, puesto que es reciclada como consecuencia de la actividad predatoria de los protozoos. Se considera que la composición aminoacídica de la proteína bacteriana es bastante constante. Sin embargo, existen estudios que muestran variación en este sentido lo que, en parte, puede reflejar diferencias en la metodología, aunque existe suficiente evidencia que indica diferencias reales en la composición, especialmente entre bacterias asociadas a las partículas y a la fase líquida del contenido ruminal (Cecava et al., 1990; Clark et al., 1992; Molina Alcaide et al., 1996; Rodríguez Prado et al., 2004).

En numerosas revisiones (Clark et al. 1992; Hoover y Stokes, 1991; Sniffen y Robinson, 1987) se exponen los factores que afectan al paso de determinada cantidad de la fracción nitrogenada al intestino delgado: tipo y cantidad ingerida de carbohidratos, de grasas y proteínas, frecuencia de alimentación y condiciones ambientales en el rumen. Los aportes de proteína y energía necesarios para el crecimiento de los microorganismos, constituyen los principales factores limitantes de la síntesis de proteína microbiana (Hoover y Stokes, 1991; Clark et al., 1992).

El metabolismo microbiano en el rumen depende, principalmente, de la cantidad y de la tasa de degradación de los carbohidratos de la dieta, que proporcionan los esqueletos carbonados y la energía, en forma de ATP, para la síntesis de proteína microbiana (Stern et al., 1994). Los microorganismos también pueden obtener energía de otras fuentes como la proteína o las grasas, pero la que pueden obtener a partir de la proteína es reducida, y de las grasas solo se fermenta el glicerol (Hvelplund y Madsen, 1985). La degradación de los carbohidratos por los microorganismos ruminales (figura 4), comienza con una fase de hidrólisis de los carbohidratos complejos hasta azúcares simples (hexosas y pentosas). A continuación, tiene lugar una fase fermentativa, vía piruvato, hasta la formación de ácidos grasos volátiles, principalmente, acetato, propionato y butirato. Dichos ácidos, se producen por la acción de enzimas bacterianos (principalmente extracelulares) y protozoarios (principalmente intracelulares) (Russell y Strobel, 1993) y su concentración y proporción, dependerá de la composición del

sustrato así como de la población microbiana que los degrade. Los ácidos grasos volátiles son, además, fuente de energía para el animal hospedador y su perfil en el rumen, puede ser importante desde el punto de vista nutritivo, no solo metabólica y fisiológicamente, sino también en relación a la eficiencia de síntesis de grasa, de leche o corporal (Lu et al., 2005). En este sentido, el ácido acético es el precursor de la grasa de la leche, mientras que el propiónico es principalmente utilizado para la biosíntesis de glucosa o los depósitos de grasa corporal. Generalmente, las dietas ricas en concentrado (carbohidratos no estructurales) producen mayor proporción de ácido propiónico, mientras que las dietas ricas en forraje (carbohidratos estructurales), producen más acético, butírico e isobutírico (Lu et al., 2005).

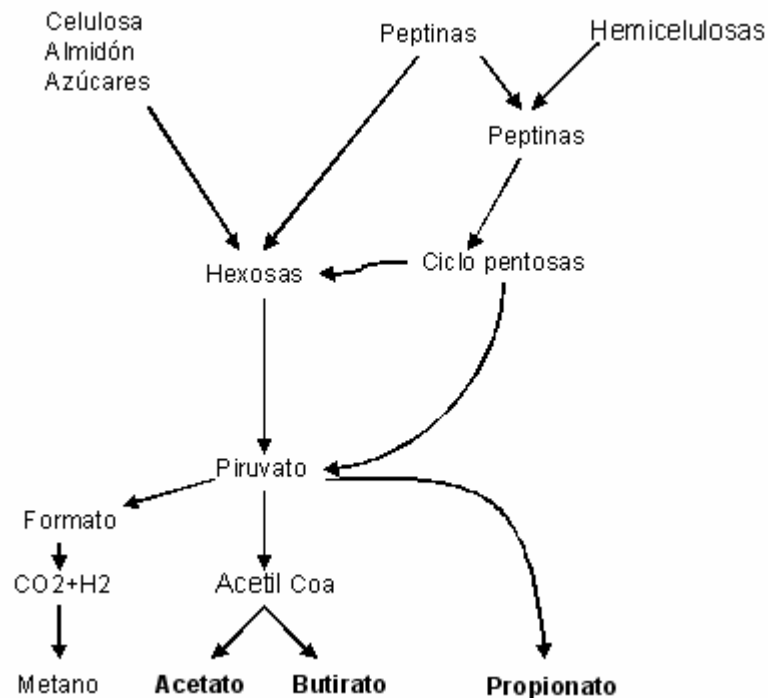


Figura 4. Degradación de los carbohidratos en el rumen. Fuente: France y Siddons (1993).

El tipo de carbohidrato aportado en la dieta condiciona la proliferación y actividad fermentativa de un grupo de microorganismos determinado (Sniffen et al., 1983). Si la dieta contiene mayor proporción de carbohidratos estructurales o fibrosos, como es el caso de una dieta forrajera, proliferan las bacterias celulolíticas, que degradan principalmente celulosa, hemicelulosa y pectina (Van Soest 1994). Las condiciones determinadas por la dieta forrajera: mayor tiempo de retención del alimento en el rumen y pH cercano a la neutralidad, propician su proliferación (McAllister et al., 1994). Por el contrario, una dieta rica en carbohidratos no estructurales o rápidamente degradables, propicia la proliferación de las bacterias amilolíticas (Theodoru y France, 1993). Los carbohidratos fácilmente fermentables, como almidón o azúcares, son más efectivos que otras fuentes de carbohidratos como la celulosa, en promover el crecimiento microbiano (Stern y Hoover, 1979).

En cuanto a la ingesta de proteínas, es importante el aporte adecuado de cantidades de N disponible cuando la energía no es limitante. Sin embargo, la relación óptima entre carbohidratos rápidamente fermentables y nitrógeno amoniacal aún no ha sido determinada. Además de la importancia de las cantidades de nutrientes aportados, hay que tener en cuenta la sincronía con la que esos nutrientes empiezan a estar disponibles. Cuando la tasa de degradación de la proteína excede la tasa de fermentación de los carbohidratos, grandes cantidades de N pueden perderse como amonio y a la inversa, cuando la tasa de degradación de los carbohidratos excede la de degradación de la proteína, la síntesis de proteína microbiana puede disminuir (Nocek y Russell, 1988). Existen estudios *in vivo* (Casper y Schingoethe, 1989; Herrera Saldana et al., 1990; Matras et al., 1991) que obtienen una respuesta positiva en el desarrollo animal, con una mejor sincronización de la disponibilidad ruminal de carbohidratos y nitrógeno, mientras que estudios con cultivos celulares (Henning et al., 1991; Newbold y Rust, 1992) no muestran mejoras.

El aporte de grasa a la dieta, podría afectar al flujo de proteína microbiana mediante la alteración de la fermentabilidad de los carbohidratos en el rumen y, posiblemente, de la cantidad de nitrógeno incorporado a la masa microbiana por unidad de carbohidrato fermentado (Stern et al., 1994). La suplementación lipídica de la dieta, produce la disminución de la digestión de los carbohidratos debido a la alteración de las condiciones del ecosistema microbiano del rumen (Fredden, 1996; Doreau y Chilliard, 1997). Se ha comprobado que los lípidos provocan una disminución del crecimiento bacteriano y de la población de protozoos, efecto que es más pronunciado con los ácidos grasos poliinsaturados (Doreau y Chilliard, 1997).

Además del aporte adecuado de carbohidratos y N, así como de otros factores nutricionales como aporte de grasas, azufre, etc., factores no nutricionales como el pH ruminal y la tasa de dilución, también son importantes en la síntesis de proteína microbiana. El pH ruminal está inversamente relacionado con el flujo bacteriano al duodeno. Un pH bajo, consecuencia del aporte de energía altamente fermentable, provoca el aumento de la síntesis de proteína microbiana (Hoover y Stokes, 1991). Por otro lado, los cambios en la tasa de dilución de las fracciones líquida y sólida del rumen, pueden ejercer un efecto importante sobre la fermentación ruminal y el crecimiento microbiano (Russel et al., 1992).

#### 2.3.4. Proteína de la dieta no degradada en el rumen

A diferencia de lo que ocurre en monogástricos, en rumiantes el perfil de aminoácidos que alcanza el duodeno difiere, considerablemente, del de la proteína de la dieta ingerida (Crooker et al., 1987; Susmel et al., 1989; Erasmus et al., 1994; O'Mara et al., 1997). La cantidad total de proteína disponible para la absorción desde el intestino delgado, depende del flujo de proteína, microbiana y de la dieta, hacia el duodeno y de sus respectivas digestibilidades intestinales. La digestión de la proteína que abandona el

rumen empieza en el abomaso, donde se da la digestión ácido-pepsina, y se completa en el intestino delgado con proteasas pancreáticas e intestinales. Se conoce que la degradación ruminal tiene mayor influencia sobre el aporte de aminoácidos al intestino delgado que la digestión postruminal (Erasmus et al., 1994; O'Mara et al., 1997). La fracción de proteína microbiana, representa entre el 40 y el 90% de los aminoácidos que llegan al intestino delgado (Sniffen y Robinson, 1987), aunque en ocasiones puede alcanzar el 100% (AFRC, 1992; Stern et al., 1994), por lo que, tradicionalmente, se ha asumido que la composición aminoacídica de la digesta que llega al intestino es poco variable, y similar a la correspondiente a los microorganismos ruminales (Oldham y Tamminga, 1980). Sin embargo, Rulquin y Verité (1993) en una revisión, muestran la existencia de importantes variaciones en todos los aminoácidos. Esta variabilidad se debería a cambios en las contribuciones relativas de proteína microbiana y la fracción de proteína de la dieta no degradable en rumen, así como de su composición aminoacídica. Parece ser, por tanto, que la degradación de aminoácidos individuales en el rumen es muy variable y dependiente del alimento. En general, se conoce que la arginina es muy sensible a la degradación ruminal mientras que las uniones peptídicas con aminoácidos ramificados son muy resistentes a la hidrólisis (Rulquin y Verite, 1993). Ceresnakova et al. (2002) estudiaron el perfil aminoacídico antes y después de la incubación ruminal durante 16 horas, en 7 suplementos proteicos, observando una tendencia hacia una mayor desaparición para el ácido glutámico, la histina, la lisina y la prolina y una menor desaparición de los amino ácidos ramificados, al igual que Rulquin y Verité (1993). Le Henaff (1991), indica que la concentración de aminoácidos de cadena ramificada tiende a aumentar y la de arginina tiende a disminuir, como consecuencia de la degradación ruminal.

En cuanto a la digestibilidad intestinal también existe variación entre suplementos proteicos, que puede tener un efecto importante sobre la disponibilidad para el animal. La digestibilidad intestinal de los aminoácidos microbianos individuales es muy similar a la de los aminoácidos totales (Storn et al., 1983), pudiéndose emplear un valor medio de 85%, sin llegar a cometer errores significativos. Sin embargo, la digestibilidad de los aminoácidos individuales de la fracción no degradable es variable, (Cros et al., 1992a,b) y presenta la limitación de que habría que emplear la corrección por la contaminación microbiana.

Los rumiantes tienen requerimientos metabólicos de aminoácidos más que de proteína, pero los sistemas de alimentación actuales no permiten la formulación de dietas basadas en la composición aminoacídica de los alimentos. Dicha formulación, requiere de información adicional: 1) contenido aminoacídico de la proteína que llega al intestino delgado, relativo al contenido total de aminoácidos del alimento; 2) absorción diferencial de aminoácidos individuales; 3) diferencias en la utilización metabólica de los aminoácidos. Por tanto, se hace necesaria la determinación de la proteína no degradable, así como de la composición aminoacídica y digestibilidad intestinal, de alimentos tradicionales, de modo que los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica

puedan predecir la absorción de aminoácidos individuales, y no solo la de aminoácidos totales (Erasmus et al., 1994; Maiga et al., 1996). Esto permitiría, por ejemplo, la selección de proteínas que presentaran elevada digestibilidad para aquellos aminoácidos que tuvieran la probabilidad de ser más limitantes para la producción.

### **Estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen**

Para la estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen, los sistemas de alimentación han adoptado valores únicos (0,8 para el NRC, 1989) o relacionados con el contenido en nitrógeno insoluble en solución ácido detergente (ADIN) asumiendo que es una fracción no digestible en el intestino (AFRC, 1992; Sniffen et al., 1992).

La estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína *in vivo*, implica experimentos costosos y laboriosos y requiere el uso de animales intervenidos quirúrgicamente. La digestión aparente de la proteína se calcula como la desaparición de la proteína bruta o de los aminoácidos entre el duodeno y el íleon. Esta metodología estaría sujeta a errores considerables asociados con el muestreo de la digesta, el uso de marcadores del flujo de la digesta y a la variación animal. Hvelplund (1985) desarrolló la técnica de los sacos móviles, que emplea animales canulados en rumen e intestino delgado proximal, y proporciona resultados altamente correlacionados con los valores de digestibilidad intestinal del nitrógeno obtenidos *in vivo* (Hvelplund, 1994). Sin embargo, se hace necesario el desarrollo de otras técnicas que requieran menos animales canulados, que sean más económicas y puedan realizarse de forma rutinaria. Para ello se han desarrollado métodos *in situ-in vitro*, basados en la hidrólisis del material predigerido en el rumen con pepsina-clorhídrico y pancreatina, que aportan datos altamente correlacionados con aquellos obtenidos por la técnica de los sacos móviles (Calsamiglia y Stern, 1995). También se han desarrollado métodos alternativos *in vitro*, como el de Antoniewicz (1992), que utiliza solo las incubaciones sucesivas en pepsina y pancreatina, y el de McNiven et al. (2002) que modificaron el método de Calsamiglia y Stern (1995) sustituyendo el paso *in situ* por un paso *in vitro*, que implica la preincubación con proteasas, seguida de la incubación en pepsina y pancreatina, permitiendo la predicción de la digestibilidad intestinal del nitrógeno, sin el uso de animales canulados. Recientemente, Gargallo et al. (2006) han realizado modificaciones del procedimiento en tres fases de Calsamiglia y Stern (1995) empleando la tecnología Daisy para la estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen. Estos autores concluyeron que la introducción de las modificaciones con respecto al procedimiento original, resultaron en la reducción del coste económico y del trabajo asociado al desarrollo de la técnica. Además, Gargallo et al. (2006) eliminan la necesidad de ácido tricloroacético, altamente corrosivo y tóxico para los humanos y el ambiente, aunque recomiendan la preincubación en el rumen.

## 2.4. EFECTO DE LA CALIDAD DE LA DIETA SOBRE LA PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE DE RUMIANTES.

Actualmente, prevalece la tendencia a determinar el valor de la leche sobre la base de sus componentes, haciendo énfasis en el contenido proteico (Murphy y O'Mara, 1993) y no en el de grasa, de mayor relevancia en el pasado. Consecuentemente, surge la necesidad de incrementar el contenido proteico de la leche mediante la combinación de dos estrategias complementarias: la nutrición y la selección genética (Murphy y O'Mara, 1993). El efecto de la composición de la dieta sobre la proteína de la leche no es muy importante pero sí más rápido que el que puede derivarse de los factores genéticos y las condiciones ambientales (Emery, 1978). Además, puesto que la grasa, tanto por su cantidad como por su perfil de ácidos grasos, determina aspectos importantes para la salud humana y transformación quesera de la leche, también se han desarrollado estrategias nutricionales para su mejora. La producción y la composición de la leche están negativamente correlacionadas en los rumiantes (Caja y Bocquier, 2000; Caja y Schmidely, 2005). Ante modificaciones de la dieta, el contenido en grasa y proteína de la leche suelen responder de manera contraria (Emery, 1978), siendo mayor la posibilidad de modificar la cantidad y composición de la grasa, que la de la proteína y/o caseína (Sutton y Morant, 1989; Caja y Schmidely, 2005).

La modificación de la producción y composición (contenido en grasa y proteína) de la leche a través de la dieta, implica considerar el estado de la lactación en el que se encuentra el rumiante (Morand-Ferh et al., 1991; Kalscheur et al. 1999), así como el nivel de ingesta (Hadjipanayiotou y Morand-Fehr, 1991; Abijaude et al. 2000).

### 2.4.1. Control de la ingesta por el rumiante

Puesto que la ingesta ejerce una gran influencia en la producción y composición de la leche (Hadjipanayiotou y Morand-Fehr, 1991), es importante el estudio de aquellos factores que la determinan. En los rumiantes, la ingesta está mayoritariamente regulada por factores desencadenados por la presencia del alimento en el rumen. La distensión del rumen y los aspectos químicos y bioquímicos derivados de la digestión ruminal posibilitan a los rumiantes el control de la ingesta de alimento (Forbes, 1995; Faverdin, 1999; Lu et al., 2005). Los nutrientes requeridos para una adecuada actividad microbiana generalmente promueven la ingesta de alimento, mientras que los nutrientes que alteran la funcionalidad del rumen (lípidos) la reducen (Faverdin, 1999). Morand-Ferh (2005) en una revisión, expone que en cabras, el déficit de nitrógeno fermentable en la dieta disminuye la ingesta, mientras que el aporte de suplementos nitrogenados, la aumenta. Con respecto al efecto de los lípidos, la infusión al duodeno generalmente reduce la ingesta, pero cuando los lípidos son ingeridos o infundidos en el rumen, la disminución es incluso mayor (Faverdin, 1999). Este efecto negativo se ha comprobado en cabras y parece ser proporcional a la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que

presenten los lípidos (Giger–Reverdin et al., 2004). El contenido en fibra del alimento es clave en la ingesta voluntaria, de modo que un incremento de la cantidad de fibra de la dieta reduce la ingesta de materia seca en cabras (Kawas et al., 1991; Santini et al., 1991; Lu et al., 2005). Además, puede disminuir la digestibilidad de algunos componentes de la dieta, excepto de la fibra, cuya digestibilidad aumenta, normalmente (Kawas et al., 1991; Lu et al., 2005).

A largo plazo, los rumiantes parecen capaces de seleccionar el alimento tanto para optimizar el funcionamiento del rumen, como para satisfacer el equilibrio nutricional que requiere el organismo (Faverdin, 1999), lo que podría explicar la buena correlación entre el nivel de ingesta y la digestibilidad. La selección del alimento por los rumiantes parece que se basa, principalmente, en su contenido en proteína bruta, mostrando, generalmente, preferencia por dietas ricas en nitrógeno degradable, de alta calidad (Faverdin, 1999).

#### 2.4.2 Efecto de la ingesta de energía sobre la producción y composición de la leche.

La ingesta energética puede incrementarse mediante la sustitución de concentrado por forraje en la dieta, o aumentando el aporte de grasa (Schingoethe, 1996). Estas estrategias, pueden producir efectos diferentes. Para el estudio de dichos efectos, es esencial conocer la digestión ruminal, así como el metabolismo de los ácidos grasos en la glándula mamaria.

#### **Digestión y metabolismo de los ácidos grasos**

La digestión de la grasa implica su hidrólisis e hidrogenación en el rumen, de modo que los ácidos grasos absorbidos en el intestino son más saturados que los presentes en la dieta (Doreau y Chilliard, 1997). La hidrólisis de los lípidos de la dieta en el rumen se produce por la acción de lipasas, galactosidasas y fosfolipasas, producidas por bacterias, principalmente, y protozoos (Harfoot y Hazlewood, 1988) que dan lugar a ácidos grasos libres. Se ha observado que ciertos factores disminuyen la lipólisis, como los antibióticos (Van Nevel y Demeyer, 1995) y valores bajos de pH (Van Nevel y Demeyer, 1996). Este último factor podría explicar la reducción de la lipólisis con dietas ricas en almidón (Gerson et al., 1985). Además, tanto la velocidad como el grado de lipólisis pueden verse influidos por la fuente de grasa, puesto que tienden a ser más altos cuando las grasas se suministran puras que cuando se encuentran protegidas (jabones cálcicos) o integradas en una estructura celular, como las semillas oleaginosas enteras (Doreau y Ferlay, 1994). Tras la lipólisis, tienen lugar la hidrogenación, siendo el primer paso la isomerización. Las hidrogenasas permiten la reducción de los ácidos grasos mediante diferentes vías, siendo el producto final, en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono, el ácido esteárico (Harfoot y Hazlewood, 1988).

Aproximadamente el 40% de los ácidos grasos de la leche de rumiantes se sintetiza en la propia glándula mamaria, utilizando como precursores acetato y  $\beta$ -hidroxibutirato, procedentes de la fermentación de los hidratos de carbono en el rumen (Chilliard et al., 2000). Esta vía es el origen de los ácidos grasos de cadena corta y media (4 a 14 átomos de carbono) y de, aproximadamente, la mitad del ácido palmítico. El resto del ácido palmítico y de los ácidos grasos de cadena larga (principalmente C18:0 y C18:1) procede de lípidos circulantes en sangre (Chilliard et al., 2000) que tienen su origen en la grasa de la dieta y de los microorganismos ruminales, así como de la grasa movilizada de las reservas corporales. Además, en la glándula mamaria existe actividad delta-9 desaturasa, a través de la cual, aproximadamente el 40% de los ácidos esteárico (C18:0) y vacénico (C18:1, trans-11), procedentes de la biohidrogenación ruminal, se convierten en ácido oleico (C18:1, cis-9) y CLA (C18:2, cis-9, trans-11), respectivamente (Chilliard et al., 2000) (Figura 5). Esta última es la vía cuantitativamente más importante (93%; Piperota et al., 2002) para la formación del CLA (C18:2, cis-9, trans-11) presente tanto en leche como en carne y, por ello, este isómero es el más abundante en dichos alimentos.

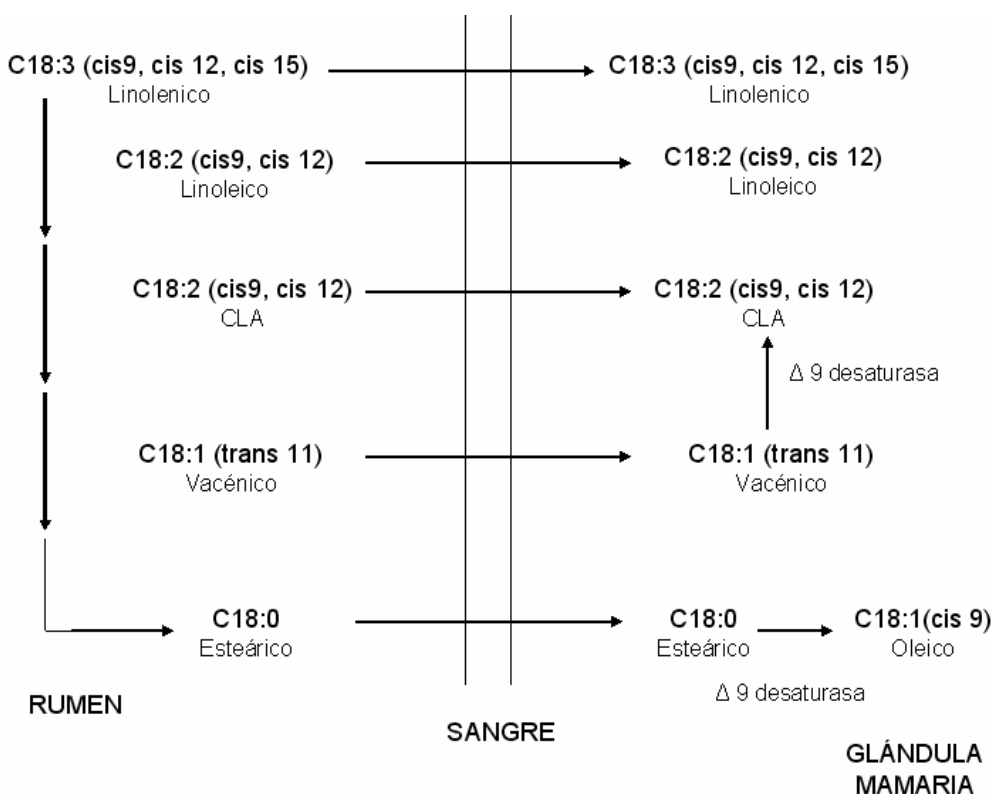


Figura 5. Vías de hidrogenación de los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono y transferencia y transformación en la glándula mamaria. Fuente: Chilliard et al. (2003).



## **Efecto de la ingesta de carbohidratos sobre la producción y composición de la leche**

El nivel de ingesta energética puede variarse modificando tanto el tipo de forraje, su forma física o el contenido en fibra, así como la relación forraje:concentrado en la dieta (Morand-Fehr et al., 2000).

Schmidely et al. (1999) y Morand-Fehr et al. (1999) observan que un incremento en el nivel de ingesta energética en cabras en lactación aumenta la producción de leche y disminuye su porcentaje en grasa. Con respecto a este último aspecto, Morand-Ferh et al. (1991) añaden que la proporción de los ácidos grasos C4-C16 se mantiene constante. Muchos estudios reflejan un ligero aumento en el contenido de la proteína y caseínas de la leche de diferentes rumiantes, debido al incremento de la ingesta energética (Rémond, 1985; Morand-Ferh et al., 1991; De Peters y Cant, 1992; Caja y Bocquier, 2000). Por otro lado, una ingesta reducida al principio de la lactación, podría disminuir la producción de leche, aumentando su contenido en grasa y, en menor medida, el de proteína (Morand-Ferh et al., 1991). Este último efecto parece deberse, principalmente, a la disminución en la producción (Rémond, 1985). Sin embargo, el aumento en el contenido de grasa en leche se debe a la movilización masiva de las grasas del tejido adiposo, principalmente de los ácidos grasos C18, de modo que se reduce significativamente la síntesis de novo de ácidos grasos de cadena corta (Morand-Ferh et al., 1991; Chilliard, 2003).

Abijaudé et al. (2000) estudiaron el efecto de la variación en la relación forraje:concentrado y en la fuente de almidón en la dieta (cebada o maíz), sobre la producción y composición de la leche en cabras. Estos autores, observaron que el contenido de grasa de la leche disminuyó significativamente, con dietas ricas en concentrado frente a dietas ricas en forraje, mientras que el contenido en proteína quedó ligeramente afectado. Estas observaciones están de acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente en diferentes rumiantes (Morand-Ferh et al., 1981; Calderon et al., 1984; Caja y Bocquier, 2000). Morand-Ferh (2005), en una revisión al respecto, expone que las cabras son extremadamente sensibles a dietas pobres en fibra y ricas en concentrado. El pH ruminal desciende cuando la proporción de concentrado en la dieta excede el 60% de la materia seca, pudiendo provocar síntomas de acidosis como la caída de la ingesta o diarrea. Calderon et al. (1984) sugieren que el caprino es menos sensible que el vacuno a una dieta deficiente en fibra disminuyendo, en menor medida, el contenido en grasa de la leche. En los estudios de Abijaudé et al. (2000), se deduce que la relación forraje:concentrado tiene menos influencia sobre la ingesta de materia seca y producción de leche que la fuente de almidón en la dieta. El almidón rápidamente degradado en el rumen procedente de la cebada, aumentó la ingesta, la producción de leche y también la acidificación ruminal en cabras en lactación. Murphy y O'Mara (1993) en una revisión exponen que el almidón rápidamente degradable produce la disminución del pH ruminal, reduciendo el número de bacterias celulolíticas y, por

tanto, la degradación de la fibra. El aumento del almidón en la dieta de vacas en lactación debería incrementar la relación propionato:acetato, resultando en mayor cantidad de proteína en leche y menor de grasa.

Con respecto al perfil de ácidos grasos de la leche de cabra, en relación al nivel de forraje en la dieta, LeDoux et al. (2002) concluyen que la leche de las cabras alimentadas con dietas ricas en forraje presentan valores mas bajos de C10:0, C12:0, y C18:2 y mayor proporción de los ácidos grasos C18:1 y C18:3 en leche que aquellas cabras cuya dieta incluía un menor nivel de forraje. Observaron que el incremento de la fracción de forraje en la dieta así como niveles altos de alfalfa COMO? (en comparación con alfalfa deshidratada), producen la disminución del contenido en ácidos grasos C18:1 trans, considerados perjudiciales para la salud. Elgersma et al. (2006) exponen que la leche producida por vacas alimentadas con forraje verde, especialmente aquellas sometidas a pastoreo, presentó mayor relación entre ácidos grasos insaturados: saturados, con valores elevados de poliinsaturados y CLA (en particular C18:2, cis-9, trans-11) que la leche producida por los animales que consumieron ensilados.

Respecto a los cambios en la forma física de la fibra de la dieta, Murphy (1995) indica que estos pueden producir alteraciones en la composición de la leche. Cuando la dieta está en forma de gránulos, el contenido de grasa en la leche puede disminuir y el de proteína aumentar debido a que el tiempo de fermentación del alimento en el rumen se reduce (Rook, 1976). Morand –Fehr et al. (1999) observan una caída en el porcentaje de grasa de la leche al sustituir heno de alfalfa, en forma de fibra larga, por granulado. Sanz Sampelayo et al. (1998) concluyen que la composición y producción de leche en cabras parece ser más sensible a la ingesta energética que a las características físicas de la dieta consumida. Sin embargo, observaron que cuando el forraje se suministraba en forma de gránulos, la utilización del nitrógeno y de la energía para producción de leche fue mejor. Por otro lado, el tamaño de partícula de la fibra de la dieta afecta al tiempo de masticación ejerciendo un efecto indirecto sobre la producción de grasa de la leche debido a la disminución de la relación acetato-propionato (Fredeen, 1996). Sutton y Morant (1989) concluyeron que el contenido de grasa de la leche se reduce con un tamaño de partícula del forraje inferior a 10 cm.

### **Efecto de la suplementación de la dieta con grasa sobre la producción y composición de la leche**

La composición lipídica de la leche de cabra y del queso refleja la composición de la grasa de la dieta (Gulati et al., 1997; Alonso et al., 2000), a pesar de la hidrogenación e isomerización de los ácidos grasos de la dieta en el rumen.

Los resultados observados en vacas (Chilliard et al., 2001), cabras (Chilliard et al., 2003) y ovejas (Caja y Bocquier, 2000) muestran que la respuesta a la suplementación de la dieta con grasa, difiere considerablemente, dependiendo de la especie. De modo

que, la producción de leche incrementa en vacas en mitad de la lactación, pero no en cabras ni en ovejas; la secreción de grasa y el contenido de la misma en leche, aumenta marcadamente en ovejas y cabras en lactación, pero no en vacas, en las que puede no haber cambios o producirse un descenso; el contenido en proteína de la leche disminuye en vacas y en ovejas, pero no en cabras. Esto se debe a que la secreción de proteína en la leche disminuye en ovejas, pero no cambia en vacas y cabras. Esta última observación está de acuerdo con las realizadas por DePeters y Cant (1992) en una revisión al respecto. Estos autores exponen que ciertos estudios sobre la influencia del aporte de grasa a la dieta en vacas en lactación, demuestran que la producción de proteína de la leche podría permanecer inalterada o incluso incrementar. Sin embargo, puesto que la producción de leche aumenta en mayor medida que la secreción de proteína, se produce una disminución en la concentración de proteína, debido a un efecto de dilución (DePeters y Cant., 1992; Schingoethe, 1996).

La grasa de la dieta tiene una influencia mayor sobre la síntesis de componentes no nitrogenados de la leche (lactosa y grasa) que sobre la de proteína. La disminución del contenido proteico de la leche podría deberse a una síntesis más eficiente de la lactosa (Schingoethe, 1996). Puesto que la lactosa es un constituyente osmótico de gran importancia en la leche y su concentración es esencialmente constante, a medida que la síntesis de lactosa aumenta, la producción de leche también lo hace. Otra posible causa sería el efecto negativo de los lípidos de la dieta sobre la proteína de la leche (Murphy y O'Mara, 1993), debido a un efecto indirecto sobre el flujo de proteína microbiana, de modo que este disminuye. Además, como se comentó anteriormente, algunos suplementos lipídicos, particularmente los ácidos grasos poliinsaturados, ejercen un efecto antimicrobiano que da lugar a una reducción de la digestibilidad de la fibra y, por tanto, de la relación acetato:propionato en el rumen (Fredeen, 1996).

El aumento de la concentración de los ácidos grasos deseados en los productos derivados de los rumiantes, puede conseguirse de varias formas: a través del aumento de la concentración de sus precursores en la dieta; por la reducción del grado de biohidrogenación en el rumen; mediante la mejora de la actividad de la enzima  $\Delta 9$  desaturasa de la glándula mamaria, que convierte el ácido vacénico en ruménico (Elgersma et al., 2006). La manipulación, mediante la alimentación, del perfil lipídico de la grasa de la leche para mejorar su calidad nutricional y tecnológica, ha recibido una atención especial durante los últimos años (Caja y Schmidely, 2005). Chilliard et al. (2003) concluyen que a pesar de las diferencias en las respuestas cuantitativas (producción de leche y contenido en grasa), los cambios en la composición de ácidos grasos de la leche, como consecuencia de la suplementación lipídica, son similares en vacas y en cabras. El principal interés se centra en la disminución de los ácidos grasos saturados, C12:0, C14:0 y C16:0, por su acción aterogénica, y en el incremento de los poliinsaturados  $\omega$ -3, cuya acción es anti-aterogénica, debido a sus efectos sobre las enfermedades cardiovasculares. Recientemente, la investigación se ha centrado en la reducción en la leche de los ácidos grasos monoinsaturados trans y en el incremento de

los isómeros del ácido linoleico conjugado (especialmente el ácido ruménico, cis-9, trans-11, C18:2), debido a su acción inhibidora del crecimiento tumoral. La suplementación de la dieta con aceites poliinsaturados (aceites vegetales y de pescado) y, en general, todos los ácidos grasos de cadena larga, conduce a una disminución de la síntesis de novo y de la concentración total de grasa en la leche (Chilliard et al., 2000). Este efecto es tanto mayor cuanto mayor es la longitud de la cadena del ácido, su grado de insaturación y su proporción de dobles enlaces en configuración trans (Chilliard, 2001). La información disponible, en cuanto a suplementos de grasa, se centra principalmente en el uso de jabones cálcicos de ácidos grasos de cadena larga.

Caja y Schmidely (2005), exponen que la inclusión de aceites protegidos y semillas oleaginosas en el alimento, incrementa el contenido de ácidos grasos mono- y poliinsaturados en la grasa de la leche, en proporción a su contenido en la dieta. Los aceites no protegidos, incrementan los ácidos esteárico y linoleico y reducen los ácidos grasos saturados en la leche, como resultado de la biohidrogenación ruminal y la desaturación parcial de estos ácidos grasos en la glándula mamaria. El contenido en CLA es mayor en leche de cabra y oveja que en la de vaca, mostrando sus valores más altos bajo condiciones de pastoreo, pero disminuye cuando el concentrado se incluye en la dieta.

Sanz Sampelayo et al. (2000) suplementaron la dieta de cabras en lactación con aceite de pescado protegido de la degradación ruminal en forma de jabones cálcicos, y obtuvieron mayor producción de leche, grasa y proteína (aún cuando la concentración de estos últimos no resultó alterada), frente a los animales alimentados sin este suplemento. Además, la leche obtenida se caracterizó por una mayor concentración de ácidos grasos poliinsaturados y menor de ácido esteárico, manteniéndose la de los ácidos grasos de cadena media. Posteriormente, Sanz Sampelayo et al. (2004) observaron, además, que los efectos persistían después de la retirada del suplemento, sobre la producción de leche, grasa y proteína, pero no sobre la composición en ácidos grasos de la misma. Sin embargo, en otro estudio parecido, en el que se aportaron cantidades diferentes de grasa protegida, no observaron cambios en la producción de leche, proteína y grasa. Teniendo en cuenta que el balance energético es el factor más importante en la determinación del contenido en proteína y grasa de la leche, diversos autores (Giger et al., 1987; Sauvant et al., 1987; Sanz Sampelayo et al. 1998) han asociado el efecto anteriormente descrito a la similitud en las ingestas de energía metabolizable. Sin embargo, sí observaron los mismos efectos que los estudios anteriores sobre la composición en ácidos grasos de la leche.

#### 2.4.3 Efecto de la fuente proteica sobre la producción y composición de la leche

Muchos estudios reflejan que existe una relación positiva entre la producción de leche y la ingesta de proteína (Rémond, 1985; Hadjipanayiotou et al., 1987; Morand-Ferh et al., 1991; DePeters y Cant, 1992). Hadjipanayiotou et al (1987), concluyen que un incremento en el contenido de la proteína bruta de la dieta de cabras en lactación (de

8% a 16%) mejoraba la producción de leche, manteniéndose la composición de la misma. Badamana et al. (1990) obtuvieron resultados similares en cabras al incrementar la cantidad de proteína en el concentrado de la dieta de 11,7 a 18,5 % de la materia seca. Sin embargo, cuando los requerimientos de la cabra están cubiertos, un incremento en la concentración de N en la dieta no afecta a la producción de leche ni a su composición (Salhu et al., 1993; Caja y Schmidely, 2005). Puesto que los requerimientos de proteína están determinados por la producción de leche, dependen del estadio de lactación siendo mayores las demandas de proteína metabolizable al principio de la lactación que posteriormente. Este aspecto queda reflejado en un estudio de Kalscheur et al. (1999), que observan que, al principio de la lactación, se produce un aumento de la producción de leche y de la cantidad de sus componentes (4% de FCM, grasa y proteína) al aumentar la cantidad de proteína en la dieta. Además, en las dietas con menor contenido en proteína, la producción de leche y sus componentes (4% FCM, grasa y proteína), aumentaba linealmente a medida que lo hacía la fracción de proteína no degradable en la dieta. Sin embargo, en la mitad y final de la lactación, las vacas alimentadas con dietas más ricas en proteína o en la fracción de la proteína no degradable, no incrementaron la producción de leche (Kalscheur et al., 1999). Otro aspecto de gran importancia en el efecto que puede ejercer el aporte de proteína de la dieta en cabras en lactación es la ingesta energética, encontrando Hadjipanayiotou y Koumas (1991) una estrecha relación. Estos autores observaron que cabras sometidas a un balance energético negativo eran más sensibles a las características de degradación del suplemento proteico que aquellas que se encontraban en balance energético positivo.

Los factores que influyen en el incremento del contenido en proteína de la leche, a través de la modificación de la dieta, son: el incremento de la cantidad global de aminoácidos que llegan al intestino delgado y la modificación del perfil aminoacídico, de modo que estén disponibles mayor cantidad de los aminoácidos esenciales y limitantes para la síntesis de proteína de la leche (Murphy y O'Mara, 1993). Según Murphy y O'Mara (1993), los aminoácidos más limitantes para la síntesis de proteína de la leche pueden pertenecer al grupo metionina, lisina, fenilalanina, histidina y treonina (Murphy y O'Mara 1993). Por otro lado, Schingoethe (1996a) indica que además de la metionina y la lisina, la histidina y los aminoácidos ramificados (valina, leucina e isoleucina) son frecuentemente los más limitantes, tanto en la dieta como en la proteína microbiana. Sin embargo, Bequette et al. (1998) empleando el balance arteriovenoso, que ha sido ampliamente utilizado para la cuantificación de los requerimientos aminoacídicos de la glándula mamaria para el metabolismo y síntesis de proteína en la leche, indicaron que los aminoácidos que no se considerarían limitantes serían valina, leucina, isoleucina, arginina, lisina y treonina, puesto que todos ellos se encontraban en exceso en la sangre con respecto a los determinados en la leche. Según Bequette et al. (1998), los aminoácidos limitantes para la síntesis de proteína de la leche serían metionina, histidina, fenilalanina y treonina, puesto que su cuantificación en sangre es considerablemente menor (de un 10 a un 70%) que en la leche, coincidiendo con lo expuesto por Murphy y O'Mara (1993). El incremento de la fracción de proteína no

degradable de la dieta, así como el aporte de aminoácidos al intestino delgado, protegidos frente a su degradación en el rumen o infundidos en el tracto digestivo posterior, son estrategias que determinan un incremento de la concentración de proteína en la leche (Murphy y O'Mara 1993). Según Fredeen (1996), la suplementación con aminoácidos protegidos permitiría suplir los requerimientos de aminoácidos con menor cantidad de nitrógeno en la dieta, resultando en una mayor eficiencia de utilización del nitrógeno y reduciendo las necesidades de proteína no degradable en el rumen.

Cuando las dietas son adecuadas, en cuanto a su contenido proteico, la reducción de la degradabilidad ruminal de la proteína, puede incrementar la producción de leche del 5 al 10% o más (Schingoethe et al., 1988). Sin embargo, muchos estudios con vacas que consumían cantidades adecuadas de proteína mostraron escasa o nula respuesta ante la inclusión de proteína no degradable en la dieta o de aminoácidos individuales (De Peters y Cant, 1992). La falta de respuesta, puede deberse a uno de los siguientes factores (Schingoethe, 1996): 1) baja digestibilidad de la proteína no degradable; 2) baja calidad de la fracción de proteína no degradada en el rumen; 3) suplementación inadecuada con aminoácidos protegidos de la degradación ruminal. Los más utilizados, puesto que son limitantes en muchas dietas y están disponibles comercialmente, son metionina y lisina; pero la suplementación de la dieta con 2-5 de los aminoácidos más limitantes es probable que produzca mayor respuesta que la suplementación con aminoácidos individuales.

Con respecto al efecto de la manipulación de la relación entre las fracciones de proteína degradable y no degradable de la dieta, sobre la producción y composición de la leche de cabra, existen varios estudios. Brun-Bellut et al. (1990) estudian el efecto de diferentes niveles de la fracción de proteína degradable de la dieta, manteniendo el nivel de proteína no degradable constante, sobre la ingesta, utilización del nitrógeno y producción de leche en cabras en lactación. Concluyen que a bajos niveles de proteína degradable en la dieta, la ingesta disminuye, al igual que el balance de nitrógeno y la producción de leche y proteína. Pailan y Kaur (1996) observaron que, en dietas isoenergéticas, manteniendo la misma cantidad de proteína, un aumento del contenido de la fracción de proteína no degradable con respecto a la fracción degradable, aumentaba la producción de leche en cabras. Respecto a la composición de la leche, el contenido en proteína no resultaba afectado y el de grasa disminuía debido a un efecto de dilución. Estos autores atribuyeron el aumento de la producción de leche a la mayor disponibilidad de aminoácidos a nivel intestinal. Mishra y Rai (1996a,b) también observaron el aumento en la producción y una mejor utilización del alimento, en términos de producción de leche, con el aumento de la fracción proteica no degradable en la dieta, sin modificar el contenido total de proteína de la misma. Además, de estos estudios se deduce, que si el contenido proteico total de la dieta disminuía en un 15% (Pailan y Kaur, 1996) o un 20% (Mishra y Rai, 1996b), la misma relación entre la fracción de la proteína degradable y no degradable, podía mantener igual la producción de leche. Estas observaciones están de acuerdo con las de Kalscheur et al. (1999), que

en vacas en lactación, con dietas pobres en proteína pero con un balance adecuado de fracción de proteína no degradable en el rumen, podrían tener efectos positivos, tanto económicos como ambientales (Kalscheur et al., 1999).

Sanz Sampelayo et al. (1999) compararon varias fuentes proteicas, de modo que todas proporcionaban el 20% del total del contenido en nitrógeno de las dietas, que contenían aproximadamente un 18% de proteína. La mayor producción de leche se alcanzó con las fuentes proteicas con menor proteína degradable (harina de girasol y semilla de algodón), mientras que los mayores porcentajes de proteína en leche se observaron con habas y gluten de maiz como fuentes proteicas; los porcentajes de grasa de la leche no se vieron influenciados por la fuente proteica incluida en la dieta.

#### 2.4 4. Consecuencias de la manipulación de la dieta sobre el valor tecnológico y la calidad organoléptica de la leche.

La calidad de la dieta influye en la de los quesos, a través de la composición de la leche producida. La concentración de grasa y proteína de la leche, son parámetros importantes para predecir la producción de queso (Caja y Bocquier, 2000). Mientras que la proteína ejerce su influencia sobre las características de coagulación, la grasa interviene en las propiedades organolépticas. La leche presenta buena aptitud para la coagulación cuando coagula rápidamente en presencia de cuajo y forma un gel firme que desuera con facilidad, generando una cuajada de textura y composición adecuadas, que tras la maduración da lugar a un queso de buena calidad. Los criterios empleados para evaluar la coagulación de la leche y definir su aptitud, son: el tiempo de coagulación, la velocidad de endurecimiento del gel, rendimiento quesero (cantidad de queso obtenida a partir de un volumen determinado de leche) y otros parámetros. La composición de la leche determina el rendimiento quesero, que es de gran importancia para los productores de queso, puesto que pequeñas diferencias en este parámetro pueden significar grandes variaciones en los beneficios económicos. Es por ello que se han desarrollado fórmulas para la predicción del rendimiento en función de los componentes de la leche (Emmons et al., 1990; Guo et al., 2004).

Morand-Fehr et al. (1991) señalaron que sería aconsejable evitar dietas ricas en proteína degradable y pobres en energía disponible para la microbiota ruminal, puesto que inducen a un contenido elevado de urea en la leche, lo cual reduce la calidad de la cuajada, efecto demostrado en vacas. Posteriormente, Morand-Fehr et al. (2000) exponen en una revisión, que las características tecnológicas de la leche para la producción de queso parecen estar poco influenciadas por la naturaleza de la fuente proteica. Sin embargo, Sanz Sampelayo et al., (1998a) obtuvieron mayor porcentaje de proteína en leche (3,50%) y rendimiento quesero (26,2) con el empleo de una dieta que incluía semilla de algodón, de mayor degradabilidad de su proteína, frente a una dieta que incluía harina de girasol (2,87 y 20,1% para la proteína de la leche y el rendimiento quesero, respectivamente), con proteína menos degradable.

El porcentaje de grasa es el principal factor determinante de la cremosidad y sabor del queso. Por tanto, no es adecuado proporcionar una dieta demasiado baja en fibra o grasa puesto que puede tener un efecto negativo sobre la secreción de ácidos grasos C4-C16 dada la escasez del precursor necesario, ácido acético, y también sobre la producción de ácidos grasos C18, que no pueden ser sintetizados por la glándula mamaria (Morand-Fehr et al., 1991). Ello podría repercutir en el sabor del queso dado que, entre los muchos factores que determinan el sabor de la leche de cabra, destacan los ácidos grasos de cadena corta (Ronningen 1965; Eknaes et al., 2000) y los ácidos ramificados C:8, iso y anteiso (Kim Ha y Lindsay, 1991; Alonso et al, 1999). El sabor del queso y los criterios de calidad, tienden a reducirse no solo cuando el porcentaje de grasa de la leche es bajo sino también cuando el porcentaje de proteína de la leche es mayor que el de grasa. Es interesante observar que, al contrario de lo que ocurre en vacas, en cabras (Morand-Ferh et al., 2000) el aporte de grasa en proporción adecuada (fuente de grasa no demasiado rica en ácidos grasos insaturados, grasa limitada a menos del 5% de la materia seca de la dieta) generalmente no reduce el porcentaje de proteína de la leche o el índice de rendimiento del queso.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. LEGUMINOSAS Y DIETAS EXPERIMENTALES

Las leguminosas grano objeto de este estudio fueron las siguientes: altramuz (*Lupinus albus*), habas (*Vicia faba*), veza (*Vicia sativa*) y yeros (*Vicia ervilia*). En base a dichas leguminosas, se diseñaron cuatro dietas experimentales para cabras en lactación, en las que el 30% de la proteína correspondía a la de una de las 4 leguminosas citadas. Las dietas se elaboraron para atender las necesidades específicas de proteína y energía calculadas para la especie caprina y raza granadina en lactación (Aguilera et al., 1990). La composición del complemento minero-vitamínico se diseñó, igualmente, con objeto de satisfacer las necesidades de Ca y P (National Research Council, 1981) de los animales. Las cuatro dietas resultaron isoenergéticas e isonitrogenadas. La composición en ingredientes de las dietas aparece en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición en ingredientes de las dietas (g/kg dieta)

Ingredientes (g/Kg)	Dietas <sup>1</sup>			
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza
Heno de alfalfa	500	500	500	500
Avena	181,5	165	105,5	150
Maíz	88,5	113	209,5	45
Altramuz	-	-	165	-
Habas	210	-	-	-
Veza	-	-	-	285
Yeros	-	202	-	-
Complemento minerovit. <sup>2</sup>	20	20	20	20

<sup>1</sup>Dietas: habas, yeros altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. <sup>2</sup>Composición por kg del complemento minero vitamínico (Premix Producción, laboratorios Musal and Chemical): fosfato bicálcico: 250 g, óxido de magnesio: 250 g, sulfato de zinc: 25 g, sulfato férrico: 25 g, sulfato de manganeso: 10 g, selenito sódico: 0,5 mg, yoduro potásico: 2 mg, cobre (heptato): 0,05%, sulfato de cobre pentahidratado: 7,5 g, bicarbonato sódico: 433 g, sulfato de cobalto: 2 mg, vitamina AD3: 0,5 g, Vitamina E 50%: 1 g).

La composición química de los ingredientes y de las dietas experimentales, así como la composición en taninos condensados y el perfil en ácidos grasos de las leguminosas, se presentan en las Tablas 3, 4, 5 y 6 del apartado 4.1 del capítulo de resultados y discusión.

#### 3.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

##### 3.2.1. Degradabilidad ruminal *in situ*

Para la determinación de la degradabilidad ruminal de las leguminosas grano y de las dietas experimentales se siguió la técnica *in sacco* descrita por Madsen y Hvelplund (1994). Se utilizaron sacos de nylon (15.800 poros/cm<sup>2</sup> y 46 µm de lado del poro) de 10 x 7cm de tamaño, previamente desecados a 60°C y tarados, en los que se introducían aproximadamente 3,5 gramos de muestra, molida con tamiz de 2mm de luz de malla.

Posteriormente, el saco se cerraba alrededor de un tapón de caucho, con una abrazadera de plástico. El tapón estaba provisto de una argolla metálica mediante la que se unía, a través de una armella giratoria, a un tubo de polietileno de 15 mm de diámetro interior y 20 cm de longitud. En cada tubo se disponían 6 sacos separados entre sí unos 3cm. De un extremo del tubo pendía un lastre de plomo, que lo mantenía en el interior del rumen. Del otro lado, una cuerda de nylon-poliéster, que mantenía el sistema en contacto con el exterior a través de la cánula.

Se realizaron incubaciones por triplicado, empleándose tres cabras de raza granadina, canuladas en el rumen y alimentadas a nivel de mantenimiento (Prieto et al., 1990) con heno de alfalfa de buena calidad y una mezcla minero-vitamínica. Los tiempos de incubación fueron de 0, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas. Tras la incubación en el rumen, los sacos se lavaban y se congelaban antes de continuar con el proceso.

Una vez realizadas todas las incubaciones, se procedía al lavado de los sacos en lavadora con programa corto, en frío. A continuación, se realizaban tres lavados con agua destilada y se desecaban en estufa de ventilación forzada a 60°C durante 48 horas. Trascorrido este proceso, los sacos se introducían en un desecador y, tras enfriarse, se pesaban. Posteriormente, se determinaba el contenido en nitrógeno del residuo seco mediante el método Kjeldahl.

Los perfiles de degradación de la materia seca y de la proteína se obtuvieron ajustando los valores obtenidos tras la incubación en el rumen al modelo  $Dg = a + b * (1 - e^{-ct})$  (Ørskov y McDonald, 1979). En este modelo no lineal, se representan las pérdidas de materia seca y nitrógeno frente al tiempo. El parámetro  $a$  representa la fracción soluble y rápidamente degradable;  $b$  representa la fracción insoluble y potencialmente degradable;  $c$  ( $h^{-1}$ ) el ritmo fraccional de degradación de la fracción  $b$ , y  $t$  el tiempo de incubación en el rumen;  $a+b$  representaría la degradación potencial. Conocidos los parámetros de degradabilidad ruminal, se estimaba la degradabilidad efectiva (DE), según la ecuación:

$$DE = a + ((b * c) / (c + K))$$

Siendo  $k$  la velocidad de paso de la digesta a través del rumen. Se consideró un valor de  $0,031 h^{-1}$ , obtenido en experimentos realizados en la Unidad de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (CSIC) de Granada, con ovino y caprino alimentados con dietas de diferente calidad (Isac et al., 1994; García et al., 1995; Molina Alcaide et al., 2000; Yañez Ruiz, 2003).

### Corrección de los valores de degradabilidad teniendo en cuenta la pérdida de partículas

El procedimiento seguido para la cuantificación de las partículas que se pierden durante el proceso, y que no son degradadas, fue el descrito por Weisbjerg et al., (1990). Se colocaba 1g de muestra molida a 2mm de luz de malla, de cada una de las leguminosas y de las dietas completas, por duplicado en un tubo de 90 ml. A continuación, se añadían 20 ml de agua destilada y los tubos se incubaban durante 1 hora a temperatura ambiente, con agitación manual cada 15 minutos. Tras la incubación, las muestras se filtraban al vacío sobre un papel de filtro libre de nitrógeno (Whatman nº 40, 90mm de diámetro) y se lavaban cuatro veces con 20 ml de agua destilada. El papel de filtro, que contenía el residuo, se desecaba a 45°C durante 48 horas. Posteriormente, se pesaba para estimar la cantidad de materia seca perdida. El nitrógeno presente en el residuo seco se determinó mediante el método Kjeldahl. Los valores individuales de la degradación en el rumen de la materia seca y de la proteína, obtenidos a los tiempos de incubación anteriormente descritos (0, 4, 8, 16, 24, 48 y 72 horas), se corregían mediante la siguiente ecuación (Weisbjerg et al., 1990):

$$KPD_i = PD_i - P * \{1 - [PD_i - (P + S)] / [1 - (P + S)]\}$$

Siendo:  $PD_i$ , el porcentaje de materia seca o de nitrógeno degradado en el tiempo de incubación  $i$ ;  $P$ , la pérdida de partículas;  $S$ , la solubilidad medida sobre papel de filtro;  $P + S$ , la fracción soluble y rápidamente degradable.

Los valores, corregidos de este modo, se ajustaban al modelo no lineal de Ørskov y McDonald (1979), obteniendo nuevos valores para  $a$  y  $b$ .

#### 3.2.2 Digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen

Se estimó la digestibilidad intestinal de las leguminosas y de las dietas experimentales de acuerdo con la técnica *in situ-in vitro* de Calsamiglia y Stern (1995) y con la técnica *in vitro* de McNiven et al. (2002).

#### Técnica *in situ-in vitro* (Calsamiglia y Stern, 1995)

En la primera etapa, *in situ*, se introducían alícuotas de aproximadamente 3,5 gramos de muestra molida a 2mm de luz de malla, en sacos de nylon (15.800 poros/cm<sup>2</sup> y 46 µm de lado del poro). Para cada alimento se emplearon dos cabras de raza granadina, provistas de canula ruminal y alimentadas a nivel de mantenimiento según se describió en el apartado anterior. En cada uno de los animales se incubaban durante 16 horas, un número de sacos determinado que dependía del contenido en nitrógeno de la

muestra y de su degradabilidad, para obtener al menos 60 mg de nitrógeno residual por animal. Los residuos no degradados de la misma muestra, se mezclaban y se tomaba una alícuota para determinar su contenido en nitrógeno.

En la segunda etapa, *in vitro*, se pesaba una alícuota del residuo no degradado en el rumen, en cantidad suficiente para que contenga 15 mg de nitrógeno. Se colocaba en un tubo de centrifuga de 50 ml de capacidad, incluyéndose dos “blancos” por tanda de incubación, que sufrirían el mismo proceso que las muestras. Se añadían, a cada tubo, 10 ml de una solución 0,1 N de HCl a pH 2, que contenía 1 g/l de pepsina (Sigma P-7012) y se incubaban durante una hora en un baño a 38°C con agitación continua.

En la última etapa de incubación, también *in vitro*, se adicionaban a cada tubo 0,5 ml de NaOH 1N con objeto de elevar el pH hasta 7,8 y 13,5 ml de solución de pancreatina en tampón de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5N a pH 7,8, que contenía 50 ppm de timol y 3 g/l de pancreatina (Sigma P-7545). Se agitaban los tubos y se incubaban en un baño a 38°C durante 24 horas, con agitación continua; además, los tubos se agitaban individualmente cada 8 horas aproximadamente. Transcurrido este periodo de tiempo, se añadían 3 ml de ácido tricloroacético al 100% p/v para detener la reacción enzimática y precipitar la proteína no digerida; se agitaban los tubos y se mantenían en reposo a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se centrifugaba a 10.000 g durante 15 minutos y se separaba el sobrenadante, conservándose hasta la posterior determinación de su contenido en nitrógeno.

La digestibilidad en pepsina-pancreatina de la proteína no degradada en rumen se calculó como la proporción entre la cantidad de nitrógeno soluble en ácido tricloroacético del sobrenadante y la de nitrógeno del residuo no degradado en rumen.

### **Técnica *in vitro* (McNiven et al., 2002)**

Para llevar a cabo las incubaciones de las muestras, tanto de leguminosas como de las dietas completas, se utilizaba la tecnología Daisy, de Ankom Technology Corporation (Ankom, 1998). Se pesaba aproximadamente 1 gramo de muestra, molido a 2mm de luz de malla en sacos de poliéster Ankom (#F57, 50  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro), se cerraban mediante sellado térmico y se agitaban enérgicamente para que la muestra se repartiera homogéneamente en su interior. Se utilizaban 4 sacos por muestra en la primera fase de incubación y 6 sacos por muestra, en la segunda. En cada fase, además, se incubaban dos sacos “blancos”, para corregir el posible contenido en nitrógeno de los sacos. Se disponían un máximo de 30 sacos en cada incubador del digestor Daisy, de 4 litros de capacidad y dotados de cierre hermético, conteniendo 1,6 litros de tampón borato (0,0345 M)-fostato (0,0551M) con un pH de 7,8-8,0. Se incubaba durante 1 hora a 39°C con agitación continua.

Tras este período de tiempo, se añadían 400 ml de solución de proteasa (Proteasa S-5147 en tampón borato fosfato). La concentración de proteasa debía ajustarse al número

de sacos, de modo que hubiera 66 unidades de proteasa por gramo de muestra. Se procedía a la incubación durante 4 horas, con agitación continua a 39°C.

Posteriormente, se decantaba el líquido y se lavaban los sacos con agua destilada tres veces. Se apartaban 4 sacos por muestra (correspondientes con la primera fase de incubación) y dos sacos “blancos” y se desecaban en estufa de ventilación forzada a 60 °C durante 48 horas. Se pesaba el residuo seco y se analizaba su contenido en nitrógeno. Los 6 sacos restantes de cada muestra (correspondientes con la segunda fase de incubación), y los otros dos sacos “blancos” se congelaban hasta completar el proceso.

En la segunda fase de incubación, se disponía de 6 sacos por muestra, procedentes de la incubación anterior y dos sacos “blancos” que se colocaban nuevamente en el digestor Daisy, con 800 ml de solución de pepsina (2 mg/ml en HCL 0,1 N). Se incubaban durante 1 hora con agitación a 39°C. Se añadían 40 ml de NaOH 1 N, y 1 l de solución de pancreatina (0,5 M de tampón fosfato, ajustado a un pH de 7,8, 50 ppm de timol y 6g/l de pancreatina). Se incubaban durante 24 h con agitación a 39°C. Para finalizar, se decantaba el líquido y se lavaban los sacos con agua destilada seis veces. Se desecaban en estufa de ventilación forzada a 60 °C durante 48 horas. Se anotaba el peso del saco y se analizaba su contenido en nitrógeno.

La degradabilidad del nitrógeno se calculaba como la diferencia entre el nitrógeno de la muestra original y el de la residual (obtenida tras la primera incubación) respecto al contenido en nitrógeno de la muestra original. La digestibilidad de la proteína no degradada en rumen, se calculaba como la diferencia entre la cantidad de nitrógeno no degradado y la de nitrógeno residual (obtenida después de la segunda incubación) respecto al nitrógeno no degradado.

### 3.2.3 Ensayos *in vivo* de valoración nutritiva y producción láctea

#### **Animales y diseño experimental**

Se utilizaron 8 cabras de raza Granadina ( $41,06 \pm 1,07$  kg de peso vivo) procedentes de la Granja Experimental de la Excma. Diputación Provincial de Granada, en la mitad de su segunda o tercera lactación. Se establecieron cuatro grupos de animales, de acuerdo con su peso y producción de leche. Se realizaron cuatro experiencias utilizando los animales anteriormente descritos, siguiendo un modelo en cuadrado latino 4x4 con dos repeticiones, de manera que el número de tratamientos (dietas experimentales), de grupos y de períodos (experiencias) era idéntico (Tabla 2).

Tabla 2. Diseño de los ensayos in vivo

Experiencia	Grupos de animales			
	1	2	3	4
1	Dieta A	Dieta H	Dieta Y	Dieta V
2	Dieta H	Dieta V	Dieta A	Dieta Y
3	Dieta V	Dieta Y	Dieta H	Dieta A
4	Dieta Y	Dieta A	Dieta V	Dieta H

Siendo las dietas A, H, V y Y aquellas en las que el 30% de la proteína es aportada por altramuz, habas, veza y yeros, respectivamente.

### Desarrollo de los ensayos

Cada animal recibía diariamente la dieta experimental correspondiente, compuesta por 1kg de heno de alfalfa de buena calidad y 1kg del concentrado, disponiendo de agua *ad limitum*. La duración de cada experiencia fue de 28 días. Durante los 20 primeros días, fase de adaptación a las dietas experimentales, los animales se disponían en boxes individuales. Después de este período se trasladaban a células individuales de metabolismo, donde se desarrollaban los ensayos de balance.

Cada día de la fase de adaptación a las dietas, a las 9:00 horas, una vez cuantificado el consumo de alimento correspondiente al día anterior, se procedía al ordeño manual de las cabras, cuantificándose también la producción de leche. Posteriormente, se suministraba la ración diaria, en primer lugar el concentrado y, dos horas más tarde, el heno de alfalfa. Transcurridos los 20 días, los animales se trasladan a las jaulas metabólicas, que permiten la recogida de heces y orina por separado. Durante los primeros tres días de esta segunda fase, que se consideraban de adaptación, se controlaba la ingesta de forraje y concentrado y se cuantificaba la excreción de heces, orina y leche. Los cinco días posteriores constituían la fase principal de los ensayos de balance, en los que se llevaba a cabo la cuantificación de los rehusos de heno de alfalfa y concentrado, así como de heces, orina y leche, tomándose alícuotas (10% para leche y orina, 20% para heces y 100% para los rehusos) para realizar los análisis correspondientes. Estas alícuotas se conservaban a -20°C, (4°C para el caso de los rehusos) hasta su posterior análisis. Tras la finalización del ensayo de balance, se recogía la leche total producida por cada lote de animales y se trasladaba a la Planta Piloto de Lácteos del CIFA de Hinojosa del Duque (Córdoba), donde se realizaban los análisis de valoración tecnológica.

#### 3.2.4. Elaboración de queso

Se siguió el protocolo experimental adaptado por Ares (1995) según receta de queso madurado tradicional de Málaga (Ares et al., 1996). El proceso de elaboración del queso comenzaba con el calentamiento, en cubeta de acero inoxidable (Selecta) y en baño con agitación, hasta alcanzar la temperatura de 32°C. A continuación, se añadía cuajo de



origen animal (30ml/l) y se realizaba el corte y picado de la cuajada hasta conseguir un tamaño similar al de un grano de arroz. Posteriormente, se agitaba y recalentaba la masa, para facilitar el desuerado de la cuajada y la cohesión y firmeza del grano obtenido tras el corte. Finalmente, se procedía al moldeado en recipientes de PVC de 500 g de capacidad y a un doble prensado, el primero con una presión de 0,5 Kg a 1,5 Kg, durante 15 minutos y, tras darle la vuelta a la masa, el segundo con una presión de 1,5 Kg, durante 15 minutos. Se pesaba el queso obtenido y se calculaba el rendimiento quesero (R1, litros de leche utilizados / Kg de queso obtenido). Seguidamente, se procedía al salado de los quesos en salmuera (14%, peso/volumen) y a 10°C, durante 30 minutos. La maduración se llevaba a cabo en cámara de maduración a 9°C y 85-88% de humedad relativa, en régimen de ventilación forzada, durante un tiempo mínimo de tres semanas. Finalizado el período de maduración, se pesaba el queso y se calculaba, de nuevo, el rendimiento quesero (R2).

### 3.2.5. Cinética de coagulación. Obtención de optigramas

Los ensayos de coagulometría se realizaron en el Departamento de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y de Montes, de la Universidad de Córdoba, en el equipo Optigraph (patente nº 96120). Se fundamenta en la medida de la atenuación de la radiación infrarroja cercana del espectro electromagnético (NIRS), al pasar por la muestra de leche durante su coagulación. A medida que la coagulación de la leche va avanzando, previo añadido del cuajo, la intensidad de la radiación recibida disminuye progresivamente. El registro, en tiempo real, de la señal recibida da lugar a la curva óptica (optigrama), a partir de la cual se obtienen los resultados de los parámetros medidos (Guyonnet, 1999).

## 3.3. TÉCNICAS ANALÍTICAS

Previamente a su análisis, las muestras se molían en un molino de cuchillas (Retsch, Mod. SM-1) con un tamiz de 2 mm de luz de malla. Cuando la técnica analítica lo requirió, se optimizó la homogenización moliendo de nuevo en molino de cuchillas (Glen Creston Ltd. 14-680 Stanmore), dotado de un tamiz de 1 mm de luz de malla.

### 3.3.1. Materia seca

Se determinó como la pérdida de peso que experimenta una muestra tras ser sometida a desecación durante 24 horas, a  $103 \pm 1^\circ\text{C}$ , en estufa de ventilación forzada según el protocolo establecido por la Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1984). Para heces y leche, la muestra requiere liofilización previa al proceso anteriormente descrito.

### 3.3.2. Materia orgánica

Las cenizas totales se obtienen por calcinación de 1 a 2 g de muestra, en horno mufla a 550°C, durante 5 horas. El contenido en materia orgánica se determina por diferencia entre 100 y el contenido porcentual de cenizas totales en la muestra, referido a materia seca.

### 3.3.3. Grasa

Para la determinación de la grasa de los ingredientes de las dietas, así como de los rehusos y heces procedentes de los ensayos de balance, se utiliza un equipo Soxhlet. La extracción se realiza sobre 2-2,5 g de muestra, molida con tamiz de 2mm de luz de malla y colocada en un cartucho de papel de filtro cerrado. Estos cartuchos se maceran en éter de petróleo durante aproximadamente 20 horas y se extraen durante 6-8 horas. Finalizada la extracción, el matraz que contiene la grasa extraída se deseca en estufa a 60°C. El aumento de peso que experimenta el matraz corresponde a la grasa procedente de la muestra.

### 3.3.4. Energía bruta

La energía bruta de las muestras de los ingredientes de las dietas experimentales, rehusos, heces, orina y leche, se determina utilizando una bomba calorimétrica adiabática. En el interior del cuerpo de la bomba se colocan 2 ml de agua destilada y, sobre el soporte de uno de sus electrodos, un crisol adecuado para la combustión. En el crisol se introduce una bolsita de polietileno, de la que se ha determinado el calor de combustión, en la que previamente se ha pesado 1 g de muestra. Entre los electrodos de la bomba se fija un trozo de hilo de níquel-cromo al que se une una hebra de algodón, cuyo extremo contacta con la bolsa que contiene la muestra. El calor de combustión de ambos tipos de hilo se determina previamente y, la longitud de los mismos se mantiene constante en las distintas determinaciones. Posteriormente, se llena el recipiente con oxígeno, hasta conseguir una presión de 30 atmósferas, y se sitúa en el interior del vaso calorimétrico que, previamente, se ha llenado con  $2.100 \pm 0,5$  g de agua. Para la determinar el contenido calórico de la muestra, se mantiene el aparato funcionando de 5 a 10 minutos para alcanzar una temperatura constante en el agua del vaso del calorímetro ( $T_i$ ); seguidamente, se induce la combustión de la muestra y se espera de 10 a 15 minutos hasta que la temperatura se estabilice ( $T_f$ ).

El calor de combustión o energía bruta de la muestra viene dado por la fórmula:

$$\text{Calor de combustión, cal/g} = (K \cdot (T_f - T_i) - a) / P$$

Siendo K la capacidad de calor efectiva, que representa la cantidad de calorías necesarias para que, en el equipo empleado, la temperatura del agua del vaso calorimétrico aumente 1°C. Se determina por combustión de un comprimido de ácido

benzóico puro, de valor calórico conocido.  $T_i$  y  $T_f$  son las temperaturas estables, previa y posterior a la combustión de la muestra, respectivamente. La temperatura es detectada con una sonda termométrica introducida en el vaso y conectada a un termómetro digital;  $a$  corresponde a la suma de calorías del hilo metálico, la hebra de algodón y la bolsa de polietileno cuya combustión se realiza conjuntamente con la de la muestra.  $P$  es el peso de la muestra, en gramos de materia seca.

### 3.3.5. Componentes fibrosos

Los componentes fibrosos de los ingredientes de las dietas, heces y rehusos, se determinan según el esquema analítico de Van Soest (Van Soest et al., 1991). Se pesan 0,5 g de muestra en sacos de poliéster (Ankom Corp. #F57) libres de nitrógeno y cenizas, previamente desecados en estufa de ventilación forzada a  $103\pm 1^\circ\text{C}$  y tarados. A continuación, se sellan con calor (selladora térmica Matachana M-06597) y se agitan energicamente para conseguir que la muestra se reparta homogéneamente. De esta manera, se colocan 24 sacos sobre un suspensor, que se introduce en la cubeta de digestión del analizador (Ankom<sup>200</sup>), a la que se añaden 2 litros de la solución correspondiente (detergente neutro o detergente ácido, para la determinación de FND y FAD, respectivamente).

La incubación en el digestor tiene una duración de 60 minutos, a partir del momento en el que la solución alcanza la temperatura de  $100^\circ\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, se aclaran los sacos, mediante tres lavados de tres minutos de duración cada uno, realizados en el digestor, con agua destilada a  $90-100^\circ\text{C}$ . A continuación, se retiran los sacos, eliminándose el exceso de agua en su interior mediante presión y se sumergen en acetona durante otros tres minutos. Posteriormente, se desecan en estufa ( $103\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas.

#### **Fibra neutro detergente (FND)**

El material celular soluble se extrae, por ebullición de la muestra durante 1 hora, en una solución de detergente neutro de lauril sulfato sódico, que contiene EDTA disódico. Los componentes solubles (carbohidratos no estructurales, pectinas, proteínas, lípidos), fácilmente utilizables desde el punto de vista nutritivo, se separan de aquellos que requieren mayor tiempo de fermentación microbiana para su utilización digestiva. Este material insoluble en detergente neutro (celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice, compuestos nitrogenados, cutina, suberina, etc.) y libre de cenizas, por calcinación a  $550^\circ\text{C}$  en horno mufla, constituye la fibra neutro detergente (FND).

#### **Fibra ácido detergente (FAD)**

Tras la digestión de la muestra con solución de detergente ácido que contiene bromuro de cetiltrimetilamonio en medio sulfúrico, se obtiene un residuo (celulosa,

lignina, sílice, compuestos nitrogenados, cutina, etc.) que se somete a calcinación a 550°C, y constituye la fibra ácido detergente (FAD).

### **Lignina ácido detergente (LAD)**

Es la fracción de la pared celular, constituida fundamental por lignina. El saco que contiene el residuo que resulta de la incubación de la muestra con detergente ácido, se sumerge en ácido sulfúrico al 72% durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, se lavan los sacos con agua destilada caliente hasta que el pH del agua de lavado sea neutro, se aclaran con acetona y se desecan a 103±1°C, durante 24 horas. Finalmente, se pesan y se incineran en horno de mufla a 550°C. El residuo libre de cenizas constituye la fracción denominada lignina ácido detergente.

#### 3.3.6. Componentes nitrogenados

### **Proteína bruta**

Se calcula a partir de los datos obtenidos en la determinación de nitrógeno total de la muestra por el método Kjeldahl, aplicando el factor multiplicador 6,25 en el caso de los ingredientes de las dietas, rehusos y heces y multiplicando por el factor 6,38 en el caso de las muestras de leche. Una alícuota de la muestra (1-2 g de los ingredientes de las dietas, rehusos y heces y 6 g para la leche) se mineraliza en ácido sulfúrico concentrado a 360°C, utilizándose un catalizador constituido por 100 partes de sulfato potásico, 6 de sulfato de cobre y 1 de selenio. Como resultado de esa mineralización, el nitrógeno de la muestra se transforma en sulfato amónico. Una alícuota del mineralizado se destila en corriente de vapor (destilador Büchi) y en presencia de un exceso de hidróxido sódico. El amoniaco producido se recoge en ácido bórico. La valoración potenciométrica de la solución se lleva a cabo con ácido clorhídrico 0,05 N hasta punto final (pH=4,64), en equipo automático provisto de un electrodo de pH.

### **Aminoácidos de la proteína de las leguminosas y de su fracción no degradable en el rumen**

Se determina el contenido en aminoácidos de muestras de las leguminosas grano objeto de estudio y de la fracción no degradable en rumen, obtenida tras incubación durante 48 horas, de cada una de ellas. Para ello se emplea la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa, previa derivatización del hidrolizado de la muestra correspondiente con fenilisotiocianato (PITC, Pierce NCI-2530). Se sigue el método Pico-Tag para hidrolizados (Cohen *et al.*, 1989) cuya bondad ha sido contrastada previamente en este departamento (Pérez Martínez, 1995).

Se pesa una alícuota de la muestra, en cantidad suficiente para que contenga aproximadamente 15 mg de proteína bruta, en un tubo Pirex de tapón roscado de 10 ml de capacidad. Se añaden 5 ml de ácido clorhídrico (HCl) 6N. Este reactivo se prepara mediante destilación simple de una solución 1:1 de HCl de 22° Beaumé y agua destilada de grado Milli-Q que contiene fenol al 1% (P/V). Los tubos con la muestra y el reactivo de hidrólisis, sin cerrar completamente, se colocan durante 10 minutos en bloque calefactor (SBH200D, Stuart) a 100°C. Tras ese tiempo, los tubos se cierran herméticamente y se mantienen en el bloque calefactor durante 24 horas.

Para cuantificar correctamente los aminoácidos metionina y cisteína, que sufren una degradación superior al resto de los aminoácidos durante la hidrólisis con HCl 6N, se lleva a cabo un proceso de hidrólisis previa por oxidación perfórmica en una serie paralela de alícuotas de las muestras. Mediante este proceso, la metionina se transforma en metionina sulfona y la cisteína en ácido cistéico (Moore, 1963). Nuevamente, se pesa una alícuota de cada una de las muestras que contenga el equivalente a 15 mg de proteína bruta y se coloca en un tubo Pyrex de tapón roscado. El reactivo perfórmico se prepara tomando 1 ml de agua oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 30% (V/V) y 9 ml de ácido fórmico (HCOOH) al 88%; se disuelve por agitación durante 30 minutos y se enfría en baño de hielo junto con los tubos que contienen las muestras, con el fin de que éstas y el reactivo alcancen la misma temperatura. Se añade 1 ml de reactivo perfórmico, se cierra el tubo firmemente y se agita, dejándolo en baño de hielo durante 16 horas. La reacción se detiene mediante la adición de 0,4 ml de ácido bromhídrico (HBR al 48%). El exceso de reactivo se elimina por evaporación al vacío en centrífuga (Speedvac, concentrador modelo SPD131DDA, dotado de una trampa de condensación RVT400, Termo Savant Instrument Inc.). La muestra, una vez oxidada, es sometida al proceso de hidrólisis de la proteína, previamente descrito.

Finalizada la hidrólisis, la muestra se somete a una reacción de derivatización diluyendo en una proporción 1:4 con agua destilada y se filtra una alícuota a través de un filtro de membrana de celulosa de 0,45 µm de tamaño de poro (Millipore PVDF 13 MM 1000 NS). Posteriormente, se colocan 25 µl del filtrado en un microvial de 8 x 40 mm, se adicionan 25 µl de una disolución 0,4 mM de patrón interno (DL-2-ácido-amino-adípico, Sigma A-0637) y se procede a la evaporación del disolvente en Speedvac. Una vez que la muestra está completamente seca, se le adicionan 25 µl de la mezcla de resecado que contiene metanol, agua y trietilamina (Sigma T-0886) en la proporción 2:2:1 y a continuación se repite el proceso de secado en Speedvac. Se añaden a cada muestra 25 µl del reactivo de derivación (metanol, agua y trietilamina y fenilisotiocianato en la proporción 7:1:1:1) y tras 10 a 20 minutos de reacción, a temperatura ambiente, se procede a eliminar el exceso de reactivo en Speedvac. Una vez obtenidos los fenil-tiocarbamil-aminoácidos, se reconstituyen en 150 µl de una disolución de tampón fosfato (Pico Tag® Sample diluent, Waters) de pH 7,4 y 5% (V/V) de acetonitrilo, de manera que las muestras quedan preparadas para su inyección en cromatógrafo. La reacción de derivación es la siguiente:



Para la separación y la detección de los aminoácidos se usa un cromatógrafo líquido de alta resolución Waters modelo 2695 (Waters Cromatografía, S.A., Madrid), en el que se instala una columna Nova Pak® C18 de 3,9 x 150 mm (Waters). El detector (Waters 2487) se fija a 254 nanómetros. Para el control de gradientes y procesado de datos se utilizó el programa Millennium 32 (Waters). El controlador de temperatura se mantiene a 36°C. Todos los reactivos empleados son de grado HPLC y el agua es previamente desionizada y purificada en un sistema Milli-Q (Millipore).

Se utilizan dos eluyentes:

*Eluyente A:* Se prepara una disolución con 19 g de acetato sódico trihidrato en un litro de agua de grado Milli-Q a la que se adicionan 0,5 ml de trietilamina (TEA) y 0,2 ml de EDTA (1 g/l). Se ajusta el pH de esta disolución a un valor de 6,29 adicionando ácido acético y se filtra a través de una membrana de 0,45 µm (HATF04700, Millipore). Se le añade acetonitrilo de grado HPLC hasta que su concentración en la disolución sea del 6% (v/v).

*Eluyente B:* Es una disolución que contiene un 60%, en volumen, de acetonitrilo en agua de grado Milli-Q y 0,2 ml de EDTA (1g/l).

El gradiente utilizado fue el siguiente :

Tiempo (minutos)	Flujo (ml/minuto)	Eluyente A, %	Eluyente B, %
0	1	100	0
15	1	54	46
15,2	1	0	100
16,7	1	0	100
17	1,5	0	100
17,2	1,5	0	100
17,5	1,5	100	0
26	1	100	0
27	1	100	0

Para la identificación y cuantificación de los aminoácidos se prepara una disolución patrón, a partir de 1 ml de una disolución madre (Pierce, NCI-0180) que contiene 17 aminoácidos (L-alanina, L-arginina, L-aspartico, L-cisteína, L-glutámico, L-glicina, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina y L-valina) en una concentración de 2,5 µmoles/ml, excepto para la cisteína cuya concentración es de 1,25 µmoles/ml. La disolución se lleva a un matraz aforado, de 25 ml de capacidad, enrasando con ácido clorhídrico 0,1N de grado HPLC. Se elabora una solución madre (25 ml) para el patrón interno (40 mM de DL-2-ácido-aminoadípico, pesado con una precisión de 0,1 mg) en HCl 0,1N. A partir de ésta, se prepara la disolución que contiene el patrón interno en una concentración aproximada de 0,4 mM.

El método de cuantificación empleado es el de calibración multinivel con patrón interno. Para construir la recta de calibrado se toman 25 y 50 y 75  $\mu$ l de disolución 0,1 mM de patrón externo, se le adicionan 25  $\mu$ l de la disolución de 0,4 mM de patrón interno y se somete a los procesos de secado, resecado y derivación antes descritos. Cada lote de 50-60 muestras va acompañado de una recta de calibración propia preparándose, tanto las muestras como los patrones (4 puntos por nivel), en el mismo lote.

Este procedimiento se sigue para la detección y cuantificación de los aminoácidos preparados mediante hidrólisis ácida de la muestra. En el caso de que se efectúa la oxidación per fórmica, previa a la hidrólisis, el procedimiento es el mismo excepto en los siguientes puntos: a) entre los aminoácidos de los patrones externos se incluye metionina sulfona y ácido cistéico y b) el pH del eluyente A es de 5,9 en lugar de 6,3.

### 3.3.7. Fracciones proteicas de la leche

#### **Nitrógeno no caseínico**

Se pesan aproximadamente 10 g de leche en un matraz aforado de 100 ml. A continuación, se añaden 75 ml de agua destilada a 40°C y 1 ml de solución de ácido acético al 10% (P/V). Se mezcla suavemente el contenido del matraz y se deja reposar durante 10 minutos. Tras este tiempo se añade 1ml de solución de acetato de sodio 1N y se mezcla de nuevo. Posteriormente, se deja enfriar el contenido del matraz a unos 20°C y se enrasa a 100 ml con agua destilada y se mezcla invirtiendo lentamente el matraz.

Cuando el precipitado de caseína y materia grasa se deposita, se filtra a través de filtro Whatman nº 40 de 90 mm de diámetro, recogiendo el filtrado sobre un matraz seco. Finalmente, se determina el contenido de nitrógeno de 50 ml de filtrado, que correspondería al nitrógeno no caseínico, mediante el método Kjeldahl. El nitrógeno caseínico se calcula como la diferencia entre el nitrógeno total y el no caseínico.

#### **Nitrógeno no proteico**

En este caso, se pesan aproximadamente 20 g de leche en un matraz de 100 ml. Se diluye hasta el enrase con solución de ácido tricloroacético al 15% (P/V) y se mezcla inmediatamente. Cuando el precipitado se ha depositado, se filtra sobre un papel Whatman nº 40 de 90mm de diámetro y se recoge el filtrado en un matraz seco. Se determina el contenido en nitrógeno de 50 ml de filtrado, que correspondería al nitrógeno no proteico, mediante el método Kjeldahl. El nitrógeno no proteico se calcula como la diferencia entre el nitrógeno total y el no proteico.

### 3.3.8. Grasa de la leche

La grasa de las distintas muestras de leche se determina mediante el método butirométrico de Gerber. Se disponen 10 ml de ácido sulfúrico Gerber (90-91%) en los butirómetros graduados Gerber. A continuación, se añaden 11 ml de leche y 1ml de alcohol isoamílico y se ajusta bien el tapón de cierre. Se mezcla el contenido del butirómetro lentamente y se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos, con calor. De esta manera se separa la grasa de los distintos componentes de la leche, obteniéndose una mezcla de ácido sulfúrico y una columna de grasa. Dado que el butirómetro es graduado, se ajusta la línea divisoria entre la mezcla del ácido sulfúrico y la columna de grasa en una marca de división entera y se lee el extremo superior de la columna de grasa en el menisco inferior.

### 3.3.9. Ácidos grasos de la leche

Se determina el perfil de ácidos grasos de las leche producida por los animales alimentados con las cuatro dietas experimentales. Se procede a la extracción y esterificación de los ácidos grasos siguiendo el procedimiento desarrollado por Sukhija y Palmquist (1988) y su posterior identificación, mediante cromatografía gaseosa.

#### **Esterificación de ácidos grasos**

Se pesa en un tubo una alícuota de leche liofilizada en cantidad suficiente para que contenga, aproximadamente, 50 mg de ácidos grasos, y se somete a un proceso de extracción y transesterificación con 1 ml de hexano y 3 ml de metanol:acetil cloruro (10:1), según la metodología propuesta por Sukhija y Palmquist (1988). Previamente se añade 1ml de estándar interno, ácido nonadecaenoico (C19:0), con una concentración de 4 mg/ml, tanto a las muestras problema como a los patrones. La muestra se mantiene en baño a 70°C con agitación continua durante 1 hora y, posteriormente, se adicionan 2 ml de hexano y 4 ml de carbonato potásico al 6% y se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos. A continuación, se traspasa la fase orgánica a otro tubo y se añade, aproximadamente, 1 gramo de sulfato sódico anhidro y, tras breve reposo, se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos. Finalmente, el sobrenadante se traspasa a un vial, para su posterior inyección en el cromatógrafo.

#### **Identificación de ácidos grasos**

Se utiliza un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT) provisto de columna capilar SP-2560 (100 m x 0,25 mm de diámetro interno x 0,2 µm) (Supelco Bellefonte, PA), equipado con detector ionizador de llama (FID). La identificación de los picos correspondientes a los diferentes ácidos grasos se



lleva a cabo por comparación de los tiempos de retención con los de una mezcla de ésteres, de ácidos grasos de perfil cromatográfico conocido (mezcla FAME de 37 ácidos grasos, Supelco Bellefonte, PA) y patrones individuales de ácidos grasos metilados (Supelco Bellefonte, PA). Para la identificación de ciertos isómeros del ácido linoleico conjugado (cis 9-trans 11 y trans 10-cis12 CLA), se emplearon determinados estándares (Matreya Inc., PA). Para la adecuada separación de los ácidos grasos, se estableció el siguiente programa de temperaturas: desde 70 hasta 100°C a 5°C/minuto, 2 minutos a 100°C, desde 100 hasta 175°C a 10°C/minuto, 34 minutos a 175°C, desde 175 hasta 225°C a 4°C/minuto, 7 minutos a 225°C. El gas portador fue el nitrógeno (presión de cabeza 40 psi) y las temperaturas de inyección y detección fueron de 250 y 275°C. El volumen de inyección fue de 5 µl, con una relación de split de 50:1. Finalmente, se toma como porcentaje de cada ácido graso, el área de pico correspondiente.

### 3.3.10. Taninos condensados

Se determina el contenido de las distintas fracciones de taninos condensados: libres (TCL), ligados a la proteína (TCP) y ligados a la fibra (TCF) en alícuotas de las leguminosas, siguiendo el procedimiento desarrollado por Terril et al. (1992), con las modificaciones propuestas por Pérez-Maldonado y Norton (1996). El procedimiento consta de dos fases. En la primera se obtienen, de forma secuencial a partir de una misma muestra, los extractos de cada fracción (libres, ligados a la proteína y a la fibra) y en la segunda, se cuantifican los taninos condensados a partir de la medida de la absorbancia del compuesto coloreado que se forma tras la reacción con una solución de butanol-HCl, utilizándose un espectrofotómetro de haz de luz simple y cubeta de cuarzo.

### **Obtención de los extractos**

Se pesan 300 mg de muestra en tubos de vidrio, provistos de tapón de rosca, y se añaden 20 ml de una solución de acetona (700 ml de acetona + 300 ml de agua y 1 g de ácido ascórbico/l). Se desgasifica con N<sub>2</sub> y se deja en agitación (manteniéndose en oscuridad) durante 150 minutos, repitiéndose el proceso dos veces más. Finalizada la extracción con la solución de acetona, se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos, se recoge el sobrenadante y se conserva el residuo sólido para posteriores extracciones.

La acetona presente en el sobrenadante se elimina en rotavapor, a una temperatura de 40°C como máximo hasta que el volumen residual es de, aproximadamente, 7 ml. La solución remanente se traspa a un tubo de vidrio de 20 ml, enjuagando los restos con éter dietílico. Se mezcla la solución con un volumen aproximadamente igual de éter dietílico, agitándose vigorosamente y dejando reposar para que se produzca la separación de las fases. Se desecha la capa superior del solvente, en la que se encuentran disueltos diversos pigmentos, mediante aspiración con pipeta Pasteur. Los

taninos condensados libres, solubles en agua, permanecen en la capa inferior a la que se le añade un volumen aproximadamente igual de acetato de etilo, procediendo una sola vez de igual forma que con el éter dietílico. En la fase superior quedan disueltos lípidos y fenoles de bajo peso molecular.

Se repite el proceso en rotavapor para eliminar cualquier traza de solvente y para reducir el volumen total a unos 5-6 ml, llevándose, posteriormente, a un volumen de 10 ml con etanol (800 ml/l). Este extracto final representa la fracción de taninos condensados libres y se almacena a 4°C hasta su posterior análisis. El residuo que se obtiene en la primera extracción se deseca a 60°C durante 12h. Una vez desecado, se añaden 5 ml de una solución SDS (10g/l de sodio dodecyl sulfato, 50/l de trietanolamina y 10 g/l de 2-mercaptoetanol). Se cierran los tubos y se colocan en un baño de agua a 100°C durante 75 minutos. Se enfría a temperatura ambiente, se agita y se centrifuga a 3000 rpm, durante 10 minutos, para obtener un sobrenadante que representa la fracción de taninos condensados ligados a la proteína. Este extracto se lleva a un volumen de 10 ml con la solución SDS y se almacena a 4°C hasta su posterior análisis. La fracción de taninos ligados a la fibra se obtiene lavando y centrifugando, dos veces en 5 ml de metanol (800 ml/l), el residuo sólido de la extracción con la solución SDS y una vez con butanol, para eliminar cualquier resto de la solución. La cantidad de tanino presente en este residuo sólido representa la fracción de taninos condensados ligados a la fibra.

### **Análisis espectrofotométrico de los taninos condensados**

Para la determinación de los taninos condensados libres y de los ligados a la fibra, se utiliza metanol al 80 % como solvente. Para la determinación de los taninos ligados a la proteína se utiliza la solución SDS. Como patrón se emplea polvo de quebracho en todos los casos. A partir de una solución madre de concentración conocida (1mg/ml) se preparan diluciones para obtener una curva patrón.

Para la cuantificación de los taninos condensados, libres y ligados a la proteína, se añaden 250 µl de cada extracto a 5 ml de reactivo butanol-HCl (700 mg de sulfato ferroso heptahidratado, disueltos en 50 ml de HCl al 38% y llevados hasta un volumen de un litro con butan-1-ol). Se cierran los tubos ligeramente, se agitan vigorosamente y se calientan en baño a 100°C durante 75 minutos. Se dejan enfriar y se lee la absorbancia a 550 nm, en espectrofotómetro de haz de luz simple, después de que la muestra se haya agitado para asegurar la mezcla del extracto añadido. La lectura se realiza con una cubeta de cuarzo de 1 cm. Para la cuantificación de los taninos ligados a la fibra se añaden 15 ml del reactivo butanol-HCl, directamente sobre el residuo. Se mantienen los tubos en un baño a 100°C durante 75 minutos, se centrifuga a 3.000 rpm durante 10 minutos y se lee en el espectrofotómetro la absorbancia del sobrenadante, siguiendo las indicaciones ya descritas para los taninos condensados libres y ligados a la proteína.

### 3.4 TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS

Para el cálculo de las variables que caracterizan la degradación ruminal de la materia seca y de la proteína bruta de las leguminosas y de las dietas experimentales, se ajustaron los valores de degradación mediante el procedimiento NLIN (Nonlinear Regresión) del programa estadístico SAS (SAS, 1989) al modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979).

Los valores obtenidos para las distintas variables, fueron analizados estadísticamente mediante el paquete estadístico Statgraphics® Plus para Windows® versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., 1994-2001). Se realizaron los siguientes análisis:

- Para la comparación de las características de degradación ruminal de la materia seca y de la proteína bruta, tanto entre leguminosas como entre dietas completas se realizó un análisis de la varianza de una vía (Statgraphics 5.1), estableciendo las diferencias entre grupos mediante el test de rango múltiple de Duncan, a un nivel  $P < 0,05$ . Para el análisis de las características de degradación de la materia seca y de la proteína bruta tanto de las leguminosas grano como de las dietas completas, corregidas o no para la pérdida de partículas, se realizó un análisis de la varianza factorial (Statgraphics 5.1). Se estudia la significación del efecto del alimento incubado, corrección o no para la pérdida de partículas y la interacción entre ambos factores. Las diferencias entre los grupos se obtuvieron mediante el test de Duncan.
- Mediante el paquete estadístico Statgraphics 5.1, se realizaron los análisis factoriales (procedimiento FACTOR) para la composición aminoacídica de las leguminosas antes y después de incubación en el rumen. El método usado para la extracción de los factores fue el de componentes principales. El método de rotación factorial seleccionado en este análisis fue el de rotación varimax, método de rotación ortogonal que minimiza el número de variables que tienen saturaciones altas en cada factor, es decir, simplifica la interpretación de los factores. El número de factores considerados, dependió de la fracción de la varianza explicada por cada uno de ellos y del posible significado de los mismos. Además se realizó un análisis multivariante factorial, similar al descrito anteriormente, para el estudio de la relación entre la naturaleza de las fuentes proteicas incluidas en la dieta y la producción de proteína láctea. En este análisis se emplearon como variables: la fracción de la proteína rápidamente degradable y lentamente degradable de las leguminosas, así como su fracción no degradada en el rumen y la composición en aminoácidos esenciales de ésta, y la proteína de la leche, tanto caseína como proteína del suero.
- Los datos experimentales obtenidos tras el estudio de la utilización digestiva y de la producción y composición de la leche se sometieron a un análisis de varianza de acuerdo a un diseño en un doble cuadrado latino 4 x 4 (4 dietas y 4 períodos

experimentales). Se utilizó el procedimiento del MLG (modelo lineal general) univariante del paquete estadístico Statgraphics 5.1. Las diferencias entre grupos se establecen utilizando el test de rango múltiple de Duncan.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA

#### 4.1.1. Leguminosas grano

La composición química de las leguminosas grano empleadas para la elaboración de las dietas experimentales, aparece en la Tabla 3. Su contenido en proteína fue elevado: 25,19, 31,88, 26,25 y 20,56% de MS, respectivamente para habas, altramuz, yeros y veza. El altramuz presentó un contenido en grasa muy superior (6,02 % de MS) al de las otras semillas. El contenido en FND resultó similar en habas, yeros y veza, con valores relativamente elevados (42,60, 45,65 y 42,29% de MS, respectivamente), y bastante menor en el altramuz (29,47% de MS). Sin embargo, la fracción lignocelulósica fue más elevada en el altramuz (18,21% de MS) que en las otras tres leguminosas (11,32, 7,69, 10,13% de MS, respectivamente para las habas, yeros y veza). El contenido en lignina de las paredes celulares fue bajo y muy similar en las cuatro leguminosas (2,31, 1,91, 1,40 y 2,09% de MS, para habas, altramuz, yeros y veza). En cuanto al contenido en energía los valores fueron también similares y elevados en las semillas estudiadas (18,75-20,39 MJ/kg de MS).

En las leguminosas consideradas se detectó la presencia de taninos condensados, en diferentes proporciones. El contenido en taninos condensados totales resultó elevado en las habas (26,23 mg/g MS), yeros (38,47 mg/g MS) y veza (19,11 mg/g MS) mientras que el altramuz presentaba un contenido bajo (2,00 mg/g MS). Entre las fracciones diferenciadas, destacó la de taninos condensados libres en habas, yeros y veza que alcanzaba valores de 20,80, 32,16 y 13,81 mg/g MS, respectivamente, frente al bajo valor encontrado en el altramuz (0,6 mg/g MS). La fracción de taninos asociados a la proteína presentó valores superiores a la de los asociados a la fibra, para todas las leguminosas.

Tabla 3. Composición química de las leguminosas grano.

	Habas	Altramuz	Yeros	Veza
MS (% MF)	88,83	89,49	88,56	90,75
% de MS				
Materia orgánica	96,51	97,08	97,17	96,84
Grasa	1,18	6,02	1,20	1,43
Proteína	25,19	31,88	26,25	20,56
FND	42,60	29,47	45,65	42,29
FAD	11,32	18,21	7,69	10,13
LAD	2,31	1,91	1,40	2,09
Minerales	3,49	2,92	2,83	3,16
EB (MJ/kg MS)	18,75	20,39	19,12	19,05
mg/g de MS				
TCL	20,8	0,60	32,16	13,81
TCF	0,77	0,06	1,09	1,31
TCP	4,66	1,34	5,22	3,99
TCT	26,23	2,00	38,47	19,11

FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente; EB: energía bruta; TCL: taninos condensados libres; TCF: taninos condensados ligados a fibra; TCP: taninos condensados ligados a proteína, TCT: taninos condensados totales.

En cuanto al perfil de ácidos grasos (Tabla 4), se han detectado cuatro de ellos en las habas, yeros y veza y seis en el altramuz. El ácido linoleico fue mayoritario en todas las leguminosas, con porcentajes de 66,84, 49,68, 71,98, 48,50% para las habas, el altramuz, los yeros y la veza, respectivamente. El segundo, en cuanto a la cantidad en que aparecía, fue el ácido oleico para las habas, el altramuz y la veza (18,89, 30,91, 33,19%) y el palmítico para los yeros (11,76%). Además, en el altramuz se detectó la presencia de ácido esteárico y araquidónico. Por otro lado, se determinó el perfil en aminoácidos de la proteína de las cuatro leguminosas y de sus respectivas fracciones no degradadas en el rumen. Los resultados correspondientes se exponen en un apartado posterior.

Tabla 4. Composición en ácidos grasos (% de MS) de las leguminosas grano.

	Habas	Altramuz	Yeros	Veza
C 16:0 (Palmítico)	11,78	9,73	11,76	13,27
C18:1 (Oleico)	18,89	30,91	8,05	33,19
C18:2 (Linoleico)	66,84	49,68	71,98	48,5
C18:3 (Linolénico)	2,49	5,25	8,21	5,04
C 18:0 (Esteárico)	-	2,62	-	-
C20:4 (Araquidónico)	-	1,81	-	-

Los resultados expuestos anteriormente, reflejan que, en general, existe gran similitud en cuanto a la composición química de las leguminosas grano empleadas en este estudio, siendo el altramuz la que más se diferencia de las otras tres (habas, veza y yeros), que pertenecen al mismo género (*Vicia*). Es importante considerar, que la composición química de las leguminosas grano puede variar en función de muchos factores: variedad (Wiseman y Cole, 1988), lugar de producción, condiciones de crecimiento, etc. (Hadjipanayiotou, 1985).



Una de las características más importantes de las leguminosas grano es su elevado contenido en proteína. En el presente estudio, los valores estuvieron comprendidos entre 21 y 32% de MS, coincidiendo con los datos aportados por otros autores (Hadjipanayiotou, 1985; Boza, 1991; Abreu y Bruno-Soares, 1998; González y Andrés, 2003). El altramuz y la veza presentaron el mayor y menor contenido proteico, respectivamente, resultando los valores observados en este estudio ligeramente más bajos que los encontrados en la bibliografía (31,88 y 20,56% de MS, frente a 39 y 28% de MS, respectivamente). El elevado contenido en proteína hace que las leguminosas grano sean adecuadas para su empleo como suplemento proteico en la alimentación animal.

Con respecto al contenido en grasa, los valores eran bajos (1-1,5% de MS) excepto para el altramuz, resultando similares a los encontrados en la bibliografía (Boza, 1991; Abreu y Bruno –Soares, 1998; González y Andrés, 2003; Nadal Moyano et al. 2004b). En cuanto a la composición en ácidos grasos, se observó que los ácidos linoleico y oleico fueron los mayoritarios en habas, altramuz y veza, coincidiendo con las observaciones de Nadal Moyano et al. (2004b), que consideran que estos ácidos suelen constituir los 2/3 del total de ácidos grasos presentes en las semillas de leguminosas. Esta característica puede ser importante, puesto que se ha observado que la composición lipídica de la leche de cabra y de los quesos refleja la composición de la grasa de la dieta (Gulati et al., 1997; Alonso et al., 2000; Sanz Sampelayo et al., 2000, 2002, 2004). En este sentido, Robinson y McNiven (1993) observaron que la suplementación de la dieta de vacas en lactación con altramuz, da lugar a un aumento de ácidos grasos hipocolesterolémicos en la leche, como consecuencia de la incorporación de los ácidos C18:1 (oleico) y C18:2 (linoleico) en la dieta; otros autores (Singh et al, 1995; Froidmont y Bartiaux-Thill, 2004) han descrito efectos similares. Moss et al. (2001) también señalaron que la alta proporción de ácidos grasos insaturados puede ser una característica importante de la fracción lipídica del altramuz, en cuanto a su posible transferencia a los productos animales (carne y leche), que resultan de una calidad más saludable. Froidmont y Bartiaux-Thill (2004) y Masucci et al. (2006) obtienen en la semilla de altramuz valores superiores para el ácido oleico, en comparación con el linoleico, al contrario de los resultados del presente trabajo (30,91 y 49,68%, para oleico y linoleico, respectivamente). Estos autores identificaron otros ácidos grasos (C10, C10:1, C14:0, C16:1, C20) en cantidades muy bajas (0,29-0,54%); estas diferencias pueden ser debidas, como se ha comentado anteriormente, a las distintas variedades, lugar, condiciones de crecimiento etc. de las semillas empleadas.

Los contenidos en FND, FAD y LAD, que se han encontrado en las leguminosas grano consideradas, resultaron, en general, más elevados que los referidos en la bibliografía. En concreto, se obtuvieron valores anormalmente elevados para la FND en el caso de habas, yeros y veza, lo que puede deberse a la presencia de mayor cantidad de cascarilla en la que se localizan mayoritariamente los componentes fibrosos (Van der Poel et al., 1991). En un estudio realizado por Abreu y Bruno-Soares (1998) se

determinó la composición química de nueve leguminosas grano, encontrándose que la mayoría presentaban valores de FND, FAD y LAD de 15-22, 6-13 y 1-2,8 % de MS, respectivamente, valores inferiores a los obtenidos en este estudio. Por el contrario, los valores encontrados por Yáñez Ruiz (2003) para las semillas de habas resultaron similares a los obtenidos en este estudio para la FAD (8,90% MS) y la LAD (1,50% MS), mientras que la FND fue inferior (27,5 % de MS). En relación a los yeros, Haddad (2006) obtiene porcentajes mayores para la FAD (9,7 %) y LAD (9,1 %), y menores para la FND (21,9%). Para la veza, Hadjipanayotou et al. (1985), obtuvieron valores tanto de FND (21,7%) como de FAD (7,5%) y de LAD (0,9%) muy diferentes a los obtenidos en este estudio. Con respecto al altramuza, los valores obtenidos en el presente trabajo son más parecidos a los encontrados en la bibliografía. Masucci et al. (2006) obtienen en el altramuza, valores de 21,2, 16,5 y 0,7 % de MS para FND, FAD y LAD, respectivamente.

En general, la información disponible en cuanto al contenido en taninos de las leguminosas consideradas en este estudio, es muy limitada. En particular, la metodología aplicada para la determinación de las distintas fracciones de taninos condensados, libres, ligados a fibra y a proteína (Pérez Maldonado y Norton, 1996), no ha sido aplicada anteriormente a los yeros y la veza, por lo que solo podría analizarse, a nivel comparativo, la información relativa a los taninos condensados totales. Además, la cantidad de taninos estimada en una muestra depende, en gran medida, del procedimiento químico empleado para dicha cuantificación (Van der Poel et al., 1991).

Se observa que, en general, la cantidad de taninos libres en el género *Vicia* (habas, veza, yeros) es elevada. Con respecto a las habas, los valores encontrados en este estudio, son similares a los obtenidos por Yáñez Ruiz (2003). Con respecto al altramuza, se conoce que el contenido en fenoles es muy reducido, presentando mayoritariamente alcaloides (Nadal Moyano et al., 2004b). Algunos autores indican que la presencia de taninos en las leguminosas podría reducir la disponibilidad de la proteína durante la digestión (McSweeney et al., 2001). Sin embargo, Nadal Moyano et al. (2004b) exponen que, en general, este efecto no sería relevante debido a que las leguminosas suelen constituir sólo una pequeña parte de la dieta de los animales. Aunque los estudios acerca del efecto que los taninos tienen sobre la utilización y el metabolismo de los nutrientes son numerosos, los relativos a su efecto sobre la calidad de los productos animales (carne, lana y leche) de los pequeños rumiantes son escasos. Los datos disponibles sugieren que bajas concentraciones de taninos condensados en la dieta aumentan la producción de lana, leche y proteína de la leche debido al incremento de la cantidad de proteína que escapa a la degradación ruminal y, por tanto, a la mayor absorción de aminoácidos a nivel intestinal (Priolo y Ben Salem, 2004). Niveles elevados de taninos condensados en la dieta pueden tener, sin embargo, efectos perjudiciales como el cambio en el color de la carne (Priolo y Ben Salem, 2004). En general, los alimentos ricos en taninos se asocian con una ingesta baja, generalmente atribuida al sabor astringente de estos taninos y también a una menor tasa de digestión

del alimento (McSweeney et al., 2001). Sin embargo, en este estudio los taninos no parecen ejercer un efecto significativo, como se verá en apartados posteriores, probablemente como consecuencia del bajo nivel de inclusión de las semillas de leguminosas en la dieta.

#### 4.1.2. Otros ingredientes de las dietas

La composición química del heno de alfalfa, avena y maíz empleados como ingredientes de las dietas experimentales, aparece en la tabla 5. La composición química del heno de alfalfa, que constituye el forraje de la dieta, revela que puede considerarse de buena calidad, presentando un contenido en proteína elevado (18,75% de MS).

Tabla 5. Composición química del heno de alfalfa, maíz y avena.

	Heno alfalfa	Maíz	Avena
MS (% MF)	91,80	86,12	91,63
% de MS			
Materia orgánica	88,20	98,81	96,87
Grasa	1,66	3,55	7,33
Proteína	18,75	7,44	11,25
FND	41,90	42,50	35,82
FAD	21,60	2,76	10,55
LAD	5,45	0,57	1,39
Minerales	11,18	1,19	3,13
EB (Kg/KJ MS)	18,00	18,83	19,80

FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente; EB: energía bruta.

#### 4.1.3. Composición de las dietas experimentales

En función de la composición química de las leguminosas grano, avena, maíz y heno de alfalfa, anteriormente descritas se elaboraron cuatro dietas, isoenergéticas e isonitrogenadas, en las que el 30% de la proteína procedía de una de las cuatro leguminosas consideradas. La composición en ingredientes de las dietas experimentales se indica en el apartado 3.1. La composición química del concentrado empleado se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición química de la fracción concentrado

	Concentrado <sup>1</sup>			
	Habas	Altramuz	Yeros	Veza
MS, g/100g MF	89,61	88,74	89,28	90,76
% de MS				
Materia orgánica	92,99	93,78	93,34	93,16
Grasa	3,82	5,05	3,74	3,35
Proteína	15,94	16,13	16,00	15,75
FND	38,28	34,96	39,71	38,66
FAD	9,10	9,50	7,26	9,22
LAD	1,58	1,17	1,16	1,66
Minerales	7,01	6,22	6,66	6,84
EB (MJ/Kg MS)	18,37	18,8	18,48	18,5

<sup>1</sup>Concentrados que incluían una de las cuatro leguminosas, habas, altramuz, yeros y veza. FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; LAD: lignina ácido detergente; EB: energía bruta.

Como se ha mencionado anteriormente, se elaboraron cuatro dietas experimentales que, aunque difieren en la leguminosa grano incluida, presentan una composición química similar, lo que permite la valoración de las cuatro leguminosas consideradas en este estudio. La diferencia más clara entre las dietas experimentales estudiadas, en cuanto a su composición química, se refiere a la cantidad de grasa (superior en la dieta que contiene altramuz) y la cantidad de FAD (menor en la dieta que contiene yeros).

## 4.2. CINÉTICAS DE DEGRADACIÓN EN EL RUMEN DE LAS LEGUMINOSAS Y DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES. EFECTO DE LA CORRECCIÓN PARA LA PÉRDIDA DE PARTÍCULAS.

### 4.2.1. Leguminosas

Las características de la degradación ruminal de las leguminosas grano estudiadas, aparecen en la Tabla 7. En general, los parámetros de la degradación ruminal de la materia seca y de la proteína seguían un patrón parecido y presentaban valores elevados. Se observa que los parámetros *a* (fracción rápidamente degradada) y *b* (fracción lentamente degradada) de la materia seca, tanto para el altramuz como para la veza, fueron significativamente distintos ( $P < 0,05$ ) de los de las demás leguminosas. La velocidad de degradación de *b* (parámetro *c*) del altramuz, resultó más elevada y significativamente distinta de la de los yeros, las habas y la veza ( $P < 0,05$ ). Con respecto a la degradabilidad efectiva (DE) no se observaron diferencias significativas entre las habas, los yeros y el altramuz, presentando unos valores de 76,98, 76,99 y 78,71%, respectivamente. En cambio, la veza presentó el valor (74,79%) menor y significativamente distinto ( $P < 0,05$ ) de los de las anteriores.

Con respecto a los parámetros de degradación ruminal, *a* y *b* de la proteína bruta, las habas presentaron los valores mayor (51,78 %) y menor (49,49 %), respectivamente y significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) de los de los yeros, la veza y el altramuz. Los valores obtenidos para la veza fueron de 38,30 % y 62,90% para *a* y *b*, respectivamente,

siendo estos valores el menor y el mayor, y significativamente distintos ( $P < 0,05$ ) en comparación con las otras tres leguminosas. Tanto los yeros como el altramuz presentaron valores medios para ambos parámetros que se sitúan entre los dos extremos mencionados, y que no son significativamente distintos ( $P > 0,05$ ): 42,02 y 40,72 % para *a*, y 58,46 y 59,53 % para *b*, respectivamente. La velocidad de degradación de *b*, para el altramuz, resultó superior ( $0,113 \text{ h}^{-1}$ ) y significativamente distinta ( $P < 0,05$ ) de la de las otras tres leguminosas, cuyos valores fueron de  $0,060$ - $0,070 \text{ h}^{-1}$ . En relación a la degradabilidad efectiva de la proteína, las habas y el altramuz presentaron los valores más elevados (86,18 y 87,47 % respectivamente) y significativamente distintos ( $P < 0,05$ ) del de los yeros (82,42%) y la veza (79,76%), que presenta el menor valor.

Tabla 7. Características de la degradación ruminal de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las leguminosas grano.

	Habas	Yeros	Altramuz	Veza	DER	Significación Estadística
<b>DMS</b>						
A (%)	38,3 <sup>a</sup>	37,1 <sup>a</sup>	25,5 <sup>b</sup>	31,6 <sup>c</sup>	1,10	***
B (%)	59,8 <sup>a</sup>	60,4 <sup>a</sup>	74,8 <sup>b</sup>	69,4 <sup>c</sup>	1,82	***
C ( $\text{h}^{-1}$ )	0,058 <sup>a</sup>	0,060 <sup>a</sup>	0,077 <sup>b</sup>	0,050 <sup>a</sup>	0,007	**
DE (%)	77,0 <sup>a</sup>	78,0 <sup>a</sup>	78,7 <sup>a</sup>	74,8 <sup>b</sup>	1,07	*
<b>DPB</b>						
A (%)	51,9 <sup>a</sup>	42,0 <sup>b</sup>	40,7 <sup>b</sup>	38,3 <sup>c</sup>	1,08	***
B (%)	49,5 <sup>a</sup>	58,5 <sup>b</sup>	59,5 <sup>b</sup>	62,9 <sup>c</sup>	1,28	***
C ( $\text{h}^{-1}$ )	0,070 <sup>a</sup>	0,069 <sup>a</sup>	0,113 <sup>b</sup>	0,060 <sup>a</sup>	0,005	***
DE (%)	86,2 <sup>a</sup>	82,4 <sup>b</sup>	87,5 <sup>a</sup>	79,8 <sup>c</sup>	0,78	***

a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de b; DE: degradabilidad efectiva; DER: desviación estándar residual. <sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma fila, los valores medios afectados por letras diferentes, resultan estadísticamente distintos ( $P < 0,05$ ). \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$ .

Puesto que, en algunos casos, el valor de la fracción rápidamente degradable (*a*) de los alimentos incubados era muy elevado, cabe suponer que existe una pérdida de partículas a través de los poros del saco, que se considerarían degradadas pero que, realmente, no lo serían. De hecho, los valores obtenidos teniendo en cuenta la pérdida de partículas (Weisbjerg et al., 1990), fueron inferiores y significativamente ( $P < 0,001$ ) distintos de los obtenidos sin tener en cuenta esa corrección. El efecto se observó para todas las leguminosas y, tanto para las características de la degradación de la materia seca como de la proteína (Tabla 8). Esto se debía a que la pérdida de partículas resultó considerable, del 15 al 20 % aproximadamente para la materia seca, mientras que para la proteína bruta las pérdidas se situaron entre el 13 y el 25%, aproximadamente, aunque para las habas llegó a alcanzar el 38,31%. En general, la corrección para la pérdida de partículas disminuye la degradación de la materia seca y del nitrógeno, sin afectar a su velocidad de degradación.

Tabla 8. Características de la degradación ruminal sin corregir y corregidas para la pérdida de partículas, de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las leguminosas grano.

Alimento incubado	Habas		Yeros		Altramuz		Veza		DER	Significación Estadística		
	Sin corregir	Corregidos	Sin corregir	Corregidos	Sin corregir	Corregidos	Sin corregir	Corregidos		A	C	AxC
<b>DMS</b>												
a (%)	38,28	30,67	37,12	30,83	25,45	21,12	31,63	26,79	1,00	***	***	*
b (%)	59,76	47,53	60,44	49,92	74,78	61,51	69,38	58,33	1,66	***	***	NS
c (h <sup>-1</sup> )	0,058	0,058	0,06	0,06	0,077	0,077	0,051	0,051	0,007	**	-	-
DE (%)	76,98	61,45	76,99	63,76	78,71	64,93	74,79	63,02	0,98	***	***	*
<b>DPB</b>												
A (%)	51,87	32,01	42,02	32,36	40,72	35,25	38,3	30,95	0,94	***	***	***
B (%)	49,49	30,16	58,46	44,76	59,53	51,32	62,9	50,5	1,15	***	***	***
C (h <sup>-1</sup> )	0,07	0,07	0,069	0,069	0,113	0,113	0,06	0,06	0,005	***	-	-
DE (%)	86,18	52,92	82,42	63,34	87,47	75,54	79,76	64,22	0,7	***	***	***

a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de b; DE: degradabilidad efectiva. DER: desviación estándar residual. A: efecto del tipo de alimento incubado; C: corrección para la pérdida de partículas; AxC: interacción alimento incubado x corrección. NS: no significativo; \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

En la figura 6 se representa el porcentaje de proteína degradada durante la incubación en el rumen, en función del tiempo de incubación, para cada leguminosa. Se puede observar que, aproximadamente, el 90% de la proteína desaparecía o se degradaba, tras 24 horas de incubación en el rumen. También es evidente que la velocidad de degradación ( $c$ ) es más elevada en el altramuz que en las otras tres leguminosas, que presentan pendientes parecidas entre sí. Además, parece clara la influencia de la corrección para la pérdida de partículas sobre la función exponencial, siendo esta más importante en las habas, seguida de los yeros, la veza y el altramuz, sin afectar a la velocidad de degradación de la fracción potencialmente degradable.

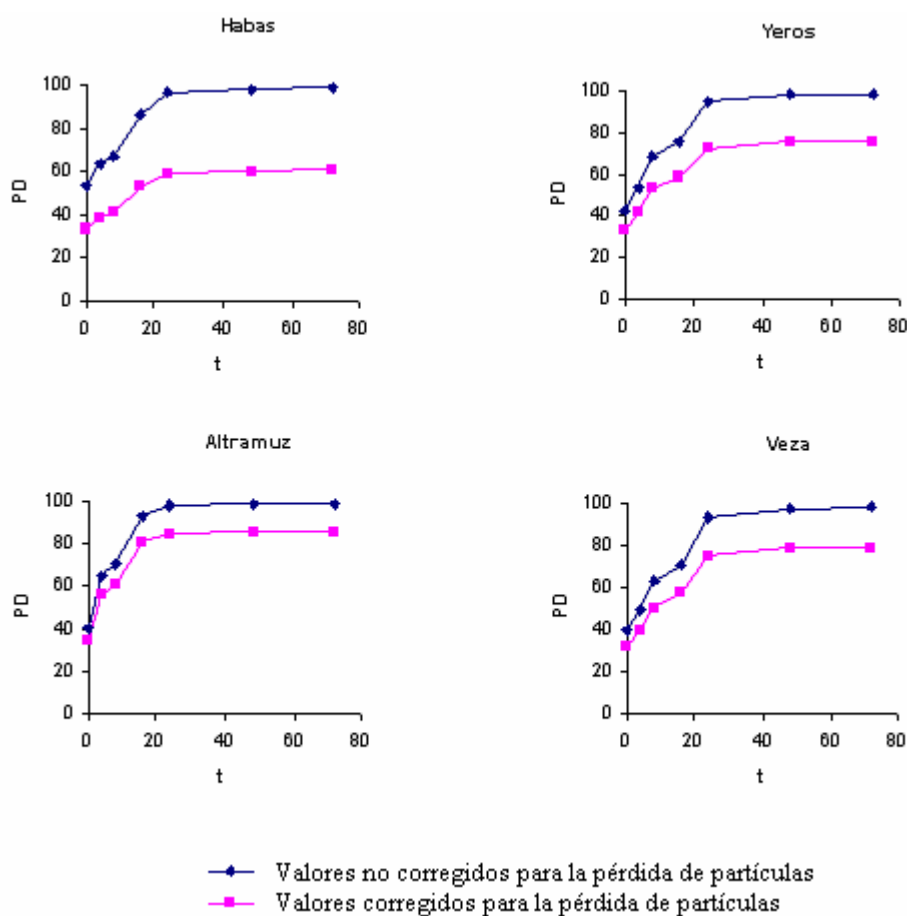


Figura 6. Porcentaje de desaparición de la proteína, sin corregir o corregido para la pérdida de partículas, de las leguminosas grano en el rumen, en relación al tiempo de incubación. PD: proteína degradada (%); t: tiempo de incubación en el rumen (horas).

#### 4.2.2. Dietas experimentales.

Las características de la degradación ruminal de las dietas experimentales (Tabla 9) difieren de las que presentaban las leguminosas. En relación a la degradación ruminal de la proteína bruta, se observa que todos los parámetros seguían el mismo comportamiento. Los valores para  $b$ ,  $c$  y DE de la dieta en la que se incluía altramuz fueron significativamente distintos ( $P < 0,05$ ) de los de las dietas que incluían las otras

tres leguminosas, mientras que para el parámetro *a* no existía significación estadística pero sí esta misma tendencia. La DE de la dieta que incluía altramuz presentaba el menor valor (75,56 %), significativamente distinto ( $P<0,05$ ) de los de las dietas que incluían habas, yeros y veza, similares (81,45, 81,54 y 80, 12 %, respectivamente) entre sí.

Tabla 9. Características de la degradación ruminal de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las dietas experimentales.

	Dietas <sup>1</sup>				DER	Significación Estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza		
<b>DMS</b>						
a (%)	39,56 <sup>a</sup>	37,17 <sup>b</sup>	33,37 <sup>c</sup>	37,85 <sup>a,b</sup>	0,99	***
b (%)	44,78 <sup>a</sup>	43,81 <sup>a</sup>	49,34 <sup>b</sup>	38,99 <sup>c</sup>	2,06	**
c (h <sup>-1</sup> )	0,061 <sup>a</sup>	0,067 <sup>a</sup>	0,040 <sup>b</sup>	0,071 <sup>a</sup>	0,010	*
DE (%)	69,01 <sup>a</sup>	67,04 <sup>b</sup>	60,78 <sup>c</sup>	64,95 <sup>d</sup>	0,98	***
<b>DPB</b>						
a (%)	48,49	47,11	44,28	46,75	1,86	NS
b (%)	45,67 <sup>a</sup>	45,67 <sup>a</sup>	49,28 <sup>b</sup>	44,35 <sup>a</sup>	1,60	*
c (h <sup>-1</sup> )	0,082 <sup>a</sup>	0,095 <sup>a</sup>	0,054 <sup>b</sup>	0,094 <sup>a</sup>	0,009	**
DE (%)	81,45 <sup>a</sup>	81,54 <sup>a</sup>	75,56 <sup>b</sup>	80,12 <sup>a</sup>	0,75	***

<sup>1</sup> Dietas habas, yeros, altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de b; DE: degradabilidad efectiva; DER: desviación estándar residual. <sup>a, b, c</sup> Dentro de una misma fila, los valores medios afectados por letras diferentes, resultan estadísticamente distintos ( $P<0,05$ ). \*  $P<0,05$ , \*\*  $P<0,01$ , \*\*\*  $P<0,001$

Si se considera la corrección para la pérdida de partículas (Tabla 10) se observa que los parámetros resultantes muestran valores inferiores y significativamente ( $P<0,001$ ) distintos de aquellos que se obtienen sin esa corrección. Esto se debe, de nuevo, al elevado porcentaje de partículas perdidas, que para la materia seca se sitúa entre 15 y 20%, mientras que para la proteína resultó ser de 11-25 %.



Tabla 10. Características de la degradación ruminal de la materia seca (DMS) y de la proteína bruta (DPB) de las dietas, corregidas y sin corregir para la pérdida de partículas.

Alimento incubado	Dieta Habas		Dieta Yeros		Dieta Altramuz		Dieta Veza		DER	Significación Estadística		
	Sin Corrección		Sin Corrección		Sin Corrección		Sin Corrección			A	C	AxC
	corregir	Corregidos	corregir	Corregidos	corregir	Corregidos	corregir	Corregidos				
<b>DMS</b>												
a (%)	39,56	32,61	37,17	29,78	33,37	28,24	37,85	30,56	0,91	***	***	NS
b (%)	44,78	36,7	43,81	34,86	49,34	41,53	38,99	31,28	1,89	***	***	NS
c (h <sup>-1</sup> )	0,061	0,061	0,067	0,067	0,04	0,04	0,071	0,071	0,009	***	-	-
DE (%)	69,01	56,75	67,04	53,54	60,78	51,32	64,95	52,3	0,89	***	***	*
<b>DPB</b>												
a (%)	48,49	36,61	47,11	38,65	44,28	39,26	46,75	39,24	1,79	NS	***	*
b (%)	45,67	34,25	45,67	37,33	49,28	43,57	44,35	37,06	1,49	***	***	*
c (h <sup>-1</sup> )	0,082	0,082	0,095	0,094	0,054	0,054	0,094	0,094	0,008	***	-	-
DE (%)	81,45	61,33	81,54	66,73	75,56	66,92	80,12	67,13	0,69	***	***	***

a: fracción rápidamente degradable; b: fracción potencialmente degradable; c: velocidad de degradación de b; DE: degradabilidad efectiva. DER: desviación estándar residual. A: efecto del tipo de alimento incubado; C: corrección para la pérdida de partículas; AxC: interacción alimento incubado x corrección. NS: no significativo; \* P<0,05, \*\* P<0,01, \*\*\* P<0,001.

En la Figura 7 se representa el porcentaje de proteína degradada durante la incubación en el rumen, con respecto al tiempo de incubación, para cada dieta. Al igual que en la Figura 6, se observa claramente el efecto de la corrección para la pérdida de partículas, aunque en este caso dicho efecto es más parecido para las distintas dietas experimentales, que cuando se estudió para las leguminosas. No obstante, el efecto de la pérdida de partículas sigue siendo mayor para la dieta que incluía habas y menor para la de altramuç, al igual que en el caso de las leguminosas.

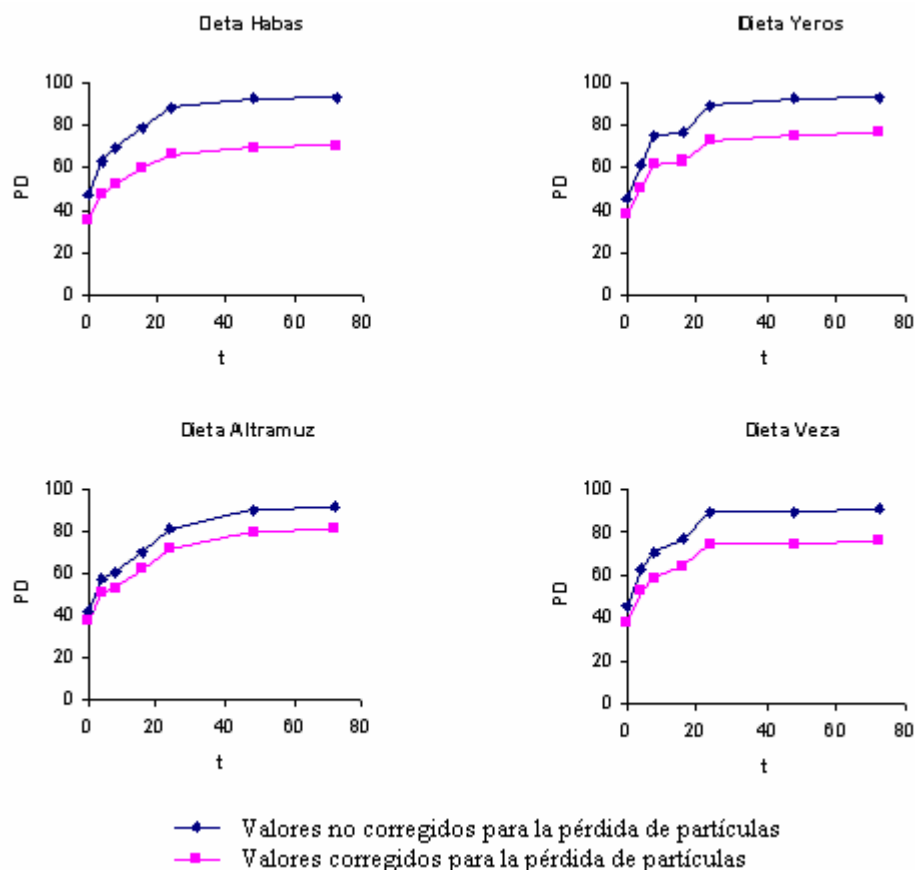


Figura 7. Porcentaje de desaparición de la proteína, sin corregir o corregido para la pérdida de partículas, de las dietas experimentales en el rumen, en relación al tiempo. PD: proteína degradada (%); t: tiempo de incubación en el rumen (horas).

La degradabilidad ruminal de la proteína constituye uno de los factores más importantes en la valoración proteica de un alimento para el rumiante, determinando el aporte de nitrógeno a los microorganismos ruminales y al animal hospedador. En el presente trabajo, se ha estimado la degradabilidad ruminal de la proteína de las distintas leguminosas grano, así como de las dietas experimentales en las que se incluyen estas semillas, mediante la técnica *in situ*, que en la actualidad es la metodología más frecuentemente utilizada en los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes. Se han incubado tanto las leguminosas como las dietas completas para estudiar el posible efecto de la interacción de los ingredientes de las dietas sobre las características de la degradabilidad de la dieta y compararlas con

las obtenidas para las leguminosas grano, puesto que la degradabilidad efectiva de los ingredientes no se considera un valor aditivo (Hvelplund y Weisbjerg, 2000). Debido a que la dieta consumida por los animales en los que se realiza la incubación afecta al perfil de degradación del alimento incubado en el rumen, especialmente al de la proteína bruta (Yáñez Ruiz et al., 2003), se alimenta a los animales en los que se incubaron las leguminosas y las dietas experimentales con heno de alfalfa de buena calidad, para evitar variaciones.

En general, la bibliografía disponible en relación a las características de degradación ruminal de las leguminosas grano no es muy abundante. Existen numerosos estudios sobre la degradabilidad del altramuza y de las habas, tanto de las semillas crudas como tratadas, pero son escasos los relativos a veza y yeros. Por otro lado, la información es muy heterogénea, dadas las numerosas fuentes de variabilidad que influyen en el estudio de la cinética de degradación ruminal. Puesto que la pérdida de partículas está relacionada con la preparación de la muestra (tipo de molienda y tamaño de malla), anterior a la incubación ruminal y que, además, el tamaño de partícula en muestras diferentes, molidas con el mismo diámetro de luz de malla puede variar (Michalet-Doreau y Cerneau, 1991), habría que considerar ambos aspectos en caso de una posible comparación con los resultados que se encuentran en la bibliografía. Moss et al. (2001) observan que la solubilidad del altramuza, tanto de la proteína como de la materia seca, incrementó con la reducción del tamaño de malla utilizada para la molienda de la muestra.

La degradabilidad de la proteína de las habas, la veza, el altramuza y los yeros, se caracterizó por elevados valores de la fracción rápidamente degradable ( $a$ ), al igual que describen González y Andrés (2003). La degradabilidad efectiva de la proteína de las distintas leguminosas resultó elevada (86,18, 82,42, 87,47, 79,76%, para habas, yeros, altramuza y veza, respectivamente), por lo que su fracción no degradable es baja. Por ello, parecería más lógico considerar a estas leguminosas como una fuente de proteína para los microorganismos ruminales y, por tanto, para la síntesis de proteína microbiana promovida por su fermentación en el rumen (Guedes y Dias da Silva, 1996; González y Andrés, 2003). Los resultados derivados de este estudio revelan que la fracción de la proteína no degradable en el rumen, podría considerarse nula en todas las leguminosas puesto que la degradabilidad potencial ( $a + b$ ) es muy elevada. Estas observaciones son similares a las descritas por Guedes y Dias da Silva (1996) y González y Andrés (2003) empleando vacas y ovejas, respectivamente. Estos últimos autores, concluyeron que la fracción de proteína no degradable en el rumen de las leguminosas era muy baja (0-5,2%), siendo la del altramuza de 0%, la de la veza de 0,4%, la de los yeros de 3,1% y la de dos variedades distintas de habas de 2,5 y 5,2%.

Los valores de los parámetros de la cinética de degradación ruminal de la proteína para las habas están de acuerdo con los estimados previamente por Sanz Sampelayo et al. (1999) en ovejas alimentadas con heno de alfalfa. Estos autores obtuvieron valores de: 53,50, 54,92, y 84,0 para  $a$ ,  $b$ , y DE, respectivamente, similares a los resultados del

presente trabajo (51,87% para *a*, 49,49% para *b* y 86,18% DE). Sin embargo, la velocidad de degradación de *b* era inferior a la estimada en este estudio (0,030 h<sup>-1</sup> frente a 0,070 h<sup>-1</sup>). Aguilera et al. (1992) obtuvieron valores de degradabilidad efectiva de habas, veza, yeros y altramuz, en ovejas alimentadas con heno de alfalfa, similares a los obtenidos en este estudio. Sin embargo, estos autores observaron valores menores para el parámetro *a* (en un 5-18%) y mayores para *b* (en un 3-15%) que los encontrados en el presente trabajo, siendo los valores correspondientes al altramuz más parecidos.

En cuanto a las características de degradación de la materia seca y de la proteína de las dietas experimentales, se observa que difieren de las estimadas para las leguminosas grano. Estos cambios son de diferente grado, en función de la leguminosa y de la dieta consideradas. Con respecto a los parámetros *a* y *b*, la mayor diferencia se observó entre la semilla de veza y la dieta que incluía esta leguminosa, mientras que el menor cambio se producía cuando se comparaban las habas y la dieta que las incluía. Con respecto a la velocidad de degradación (*c*), el altramuz presentaba el mayor valor (0,113 h<sup>-1</sup>) y significativamente ( $P < 0,05$ ) distinto de los de las otras tres leguminosas (0,060-0,070 h<sup>-1</sup>). En el caso de las dietas experimentales, aunque sigue existiendo esta diferencia estadística para el parámetro *c* de la dieta que incluía altramuz con respecto a las otras tres dietas, es de sentido contrario, siendo de 0,054 h<sup>-1</sup> frente a 0,082, 0,095 y 0,094 h<sup>-1</sup>, para las dietas que incluían habas, veza y yeros, respectivamente. Con respecto a la degradabilidad efectiva, los cambios son menores, siendo el más notable el que existe entre la dieta que incluía altramuz, con un porcentaje del 75,56 %, frente al de la semilla de altramuz que es del 87,47%. Aunque no se han determinado las características de degradación en el rumen del heno, avena y maíz, se podría intuir que la degradabilidad efectiva de los ingredientes no se considera un valor aditivo, como exponen otros autores (Hveplund y Weisbjerg, 2001). Por tanto, existen diferencias en las características de degradación entre las leguminosas y las dietas experimentales y, aunque *a priori* consideremos una fuente proteica de determinada naturaleza, su inclusión en una dieta puede hacer que la interacción con otros ingredientes resulte en distintas propiedades de degradación, ejerciendo, por tanto, distintos efectos en el metabolismo de la proteína en el rumiante, producción de leche, etc. Estos resultados están de acuerdo con los de Prestløkken (1999), que exponía que no es correcto asumir que la degradación ruminal de los ingredientes individuales refleje la degradación de una dieta.

La degradabilidad potencial resultó también elevada (94,16, 92,78, 93,66 y 91,10 %, para las dietas que incluían habas, yeros, altramuz y veza, respectivamente), por lo que la fracción de proteína no degradada en rumen, estaría en torno a 5,84-8,9 %. Tanto en las leguminosas como en las dietas experimentales, la fracción de proteína degradable podría exceder los requerimientos del rumiante, lo que implicaría el aumento de la producción de amonio en el rumen y la eliminación de este a través de la orina (Broderick, 1991), con las consecuencias ambientales asociadas. Es por ello que

se deben elaborar dietas que presenten la cantidad óptima de proteína degradable a nivel del rumen, para satisfacer tanto la rentabilidad (máximos ingresos debidos a la producción de leche sobre los costos de alimentación) como la calidad ambiental (Reynal y Broderick, 2003) asociada a la producción animal. Las dietas experimentales evaluadas podrían ser tratadas o suplementadas con proteína no degradable para alcanzar una relación más adecuada entre esta fracción y la no degradable.

Con respecto a la corrección para la pérdida de partículas, como se expuso anteriormente, produce cambios significativos en todos los parámetros de la degradación ruminal, tanto de la materia seca como de la proteína, excepto en la velocidad de degradación de b, y en la degradabilidad efectiva. La pérdida de partículas, calculada para la materia seca, de las leguminosas y de las dietas experimentales fue parecida. Sin embargo, esta pérdida, calculada para el nitrógeno de las leguminosas y de las dietas, varió en mayor medida. En general las dietas experimentales sufrieron menores pérdidas de nitrógeno, asociadas a la pérdida de partículas, que las leguminosas. Se ha observado que la mayor diferencia fue la encontrada entre la pérdida de nitrógeno asociada a la pérdida de partículas de la semilla de habas y de la dieta que incluía habas (24,50% de la dieta que incluía habas frente a 38,31% de la semilla de habas). En general, la elevada pérdida de partículas podría atribuirse a la molienda de la muestra, tanto de las leguminosas como del resto de ingredientes de las dietas, anterior a la incubación en el rumen. El proceso de molienda puede producir en algunas semillas la rotura del núcleo, dejando el almidón y la proteína como un polvo fino que puede perderse a través de los poros del saco (Prestløkken, 1999). En la bibliografía no se han encontrado estimaciones de las características de degradación de las leguminosas con corrección para la pérdida de partículas aplicadas a leguminosas grano. Los resultados obtenidos en este estudio, reflejan que el grado de pérdida de partículas varía entre leguminosas ejerciendo, por tanto, efectos de distinta magnitud sobre las características de degradación de la materia seca y de la proteína. Aplicando dicha corrección, el valor de la fracción no degradable en el rumen para las dietas experimentales estaría en torno a 17,17-29,14 %, lo que nos hace pensar que si la corrección ha sido aplicada adecuadamente, la relación entre la fracción degradable y la no degradable, se acercaría más a las recomendadas para dietas de rumiantes en lactación cuando se tiene en cuenta la pérdida de partículas.

#### 4.3. PERFIL AMINOACÍDICO DE LA PROTEÍNA DE LAS LEGUMINOSAS Y DE SU FRACCIÓN NO DEGRADADA EN EL RUMEN

Tanto para rumiantes como para monogástricos, el factor más importante que determina la eficiencia de utilización de la proteína es el perfil de aminoácidos esenciales digestibles que llegan al intestino delgado. Para la determinación de la composición aminoacídica de la fracción de proteína que llega al intestino, es

necesario conocer el perfil de la proteína microbiana y el de la proteína de la dieta que no se ha degradado a nivel del rumen. En este estudio, se ha determinado tanto el perfil en aminoácidos de las leguminosas grano como el de su fracción no degradable, estimado a partir de muestras procedentes de los residuos que permanecen en los sacos de nylon tras la incubación en el rumen de caprino durante 48 horas (Tablas 11 y 12).

Tabla 11. Composición aminoacídica de la proteína de las leguminosas grano y de su fracción no degradable en rumen (mg de aa/g de MS).

	IHabas		Yeros		Altramuz		Veza	
	Original	ND	Original	ND	Original	ND	Original	ND
AAE								
Lisina	16,10	2,64	18,99	3,5	15,07	4,45	14,92	4,48
Histidina	6,05	2,03	7,91	2,27	9,20	2,93	6,66	2,92
Treonina	6,66	0,78	7,44	2,31	8,77	3	6,03	2,69
Arginina	19,13	2,70	21,6	3,11	32,20	2,68	13,91	5,95
Valina	9,25	1,77	10,42	2,24	11,39	3,33	8,98	4,41
Isoleucina	7,84	1,35	9,02	1,79	10,77	2,38	7,80	3,48
Leucina	14,08	2,23	16,04	3,11	17,47	3,54	12,3	5
Fenilalanina	8,95	1,57	9,98	2,33	11,06	2,69	8,95	3,68
Metionina	6,55	0,99	5,84	1,38	4,13	2,39	5,33	2,93
AANE								
Tirosina	6,69	2,26	7,92	2,06	10,93	2,81	6,19	3,44
Aspártico	18,65	2,85	26,2	1,88	23,61	5,71	15,76	3,82
Glutámico	27,76	4,28	37,2	3,24	51,72	4,87	26,50	8,17
Serina	8,54	1,55	9,98	2,65	12,65	4,51	7,87	3,51
Glicina	7,74	3,81	9,03	2,79	10,99	2,63	7,18	4,51
Alanina	8,16	1,53	8,87	2,3	8,69	2,75	7,23	4,27
Prolina	9,48	1,75	11,6	2,02	14,63	2,78	9,96	3,58
Cisteina	4,72	1,26	4,33	1,45	5,46	2,26	3,05	2,16
AAE	94,6	16,1	107,3	22	120,1	27,4	84,9	35,5
AANE	91,8	19,3	115,1	18,4	138,7	28,3	83,7	33,5
Total AA	186	35,34	222	40,4	259	55,7	169	69

ND: fracción de la proteína no degradable en el rumen. AAE: aminoácidos esenciales; AANE: aminoácidos no esenciales.

En cuanto al contenido de aminoácidos totales de las leguminosas (Tabla 11), el altramuz y los yeros presentan mayor cantidad (259 y 222 mg aa/g MS, respectivamente) que las habas y la veza (186 y 169 mg aa/g MS). Respecto a la composición, el porcentaje de aminoácidos esenciales (Tabla 12) es similar para todas las fuentes proteicas, situándose entre 46,4 y 50,8% para altramuz y habas, respectivamente. Se puede destacar que los aminoácidos más abundantes para las cuatro leguminosas, fueron: ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina y leucina.

12. Composición aminoacídica de la proteína de las leguminosas grano y de su fracción no degradable en rumen (g aa/ 100 g de aa).

	Habas		Yeros		Altramuz		Veza	
	Original	ND	Original	ND	Original	ND	Original	ND
AAE								
Lisina	8,64	7,47	8,54	8,65	5,82	7,99	8,85	6,49
Histidina	3,25	5,74	3,56	5,61	3,56	5,26	3,95	4,23
Treonina	3,57	2,22	3,35	5,72	3,39	5,39	3,58	3,9
Arginina	10,3	7,64	9,73	7,69	12,4	4,82	8,25	8,63
Valina	4,96	5,00	4,69	5,55	4,4	5,98	5,33	6,39
Isoleucina	4,21	3,82	4,06	4,42	4,16	4,27	4,63	5,05
Leucina	7,56	6,3	7,21	7,69	6,75	6,35	7,3	7,25
Fenilalanina	4,8	4,44	4,49	5,75	4,28	4,83	5,31	5,34
Metionina	3,51	2,8	2,63	3,41	1,6	4,29	3,16	4,25
AANE								
Tirosina	3,59	6,39	3,56	5,1	4,23	5,04	3,67	4,99
Aspártico	10	8,06	11,8	4,64	9,12	10,3	9,35	5,54
Glutámico	14,9	12,1	16,7	8,02	20	8,74	15,7	11,8
Serina	4,58	4,38	4,49	6,54	4,89	8,09	4,66	5,08
Glicina	4,15	10,8	4,06	6,91	4,25	4,72	4,26	6,54
Alanina	4,38	4,33	3,99	5,7	3,36	4,94	4,29	6,19
Prolina	5,09	4,95	5,21	4,99	5,65	4,98	5,91	5,19
Cisteina	2,53	3,57	1,95	3,59	2,11	4,06	1,81	3,13
AAE	50,8	45,4	48,3	54,5	46,4	49,2	50,4	51,5
AANE	49,2	54,6	51,8	45,5	53,6	50,8	49,7	48,5
Total AA	100	100	100	100	100	100	100	100

ND: fracción de la proteína no degradable en el rumen. AAE: aminoácidos esenciales; AANE: aminoácidos no esenciales.

Con respecto al contenido de aminoácidos de la fracción de la proteína de cada leguminosa no degradada en el rumen (Tabla 11), las de veza y altramuz presentan valores superiores (69,0 y 55,7 mg aa/g MS, respectivamente) a las de los yeros y las habas (40,4 y 35,3 mg aa/g MS, respectivamente). Por tanto, si se compara el contenido en aminoácidos (mg de aa/g de MS) de la proteína de las leguminosas antes y después de su incubación en rumen, se observa que aproximadamente el 20% del total de los aminoácidos no se degradarían en el rumen y pasaría al intestino delgado en el caso de habas, yeros y altramuz, siendo este valor del 40% para la veza. El porcentaje de aminoácidos esenciales y no esenciales de la proteína no degradada en el rumen, está en torno al 50% para todas las leguminosas, aunque el patrón de degradación de los aminoácidos no es el mismo, siendo los mayoritarios en esta fracción distintos entre leguminosas. Cuando se compara la calidad aminoacídica de una fuente proteica y de su fracción no degradable en rumen, habría que considerar el posible error debido a la contaminación microbiana producida por la colonización de las partículas del alimento por microorganismos del rumen (Varvikko y Lindberg, 1985). Cabe suponer que su influencia sea mínima, de acuerdo con las observaciones de Varvikko (1986), en alimentos ricos en proteína.

En general, el cambio en la composición aminoacídica entre la proteína original y su fracción no degradable en el rumen fue del orden de 0,05-3%, aunque para ciertos

aminoácidos la modificación llegó a ser de entre 6 y 11%. Los cambios más destacados en las habas, tras la incubación en el rumen, son el aumento de la glicina y la tirosina, en un 160,2 y 78,0%, respectivamente, y la disminución de la arginina y glutámico, en un 25,8 y 18,8%, respectivamente. En cuanto a la composición en aminoácidos del altramuz, se observa una caída del glutámico (en un 56,3%) y de la arginina (61,1%), como consecuencia de la degradación ruminal. En los yeros y la veza los cambios más significativos, debidos a su degradación en el rumen, se producen en el glutámico y el aspártico, que disminuyen (para los yeros en un 52,0 y 60,7%, respectivamente, y para la veza en un 24,8 y 40,7%, respectivamente). En los yeros también se observó una disminución (21,0%) de la arginina mientras que, en la veza este aminoácido no experimentó ningún cambio como consecuencia de la incubación en el rumen.

La información disponible con respecto al perfil aminoacídico de la proteína de las leguminosas grano y de su fracción no degradable en el rumen es escasa, sobre todo para la veza y los yeros. En general, las leguminosas grano son deficientes en metionina y cisteína (Boza, 1991; Duranti y Gius, 1997; Nadal Moyano et al. 2004). Sin embargo, los valores estimados para estos dos aminoácidos, en cada una de las leguminosas estudiadas, resultaron muy superiores a los referidos en la bibliografía (Cros et al., 1992a,b; Aguilera et al., 1992; Sanz Sampelayo et al., 1999; Hadjipanayiotou y Economides, 2001). El perfil aminoacídico de las habas es similar al obtenido por Aguilera et al. (1992), Cros et al. (1992b) y Sanz Sampelayo et al. (1999), aunque difiere del obtenido por Hadjipanayiotou y Economides (2001). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, en este estudio se han obtenido valores superiores, con respecto a los de la bibliografía, para la metionina (3,51 % frente a 0,7-1,1 %) y cisteína (2,43 % frente a 0,4-1,0 %). En cuanto al altramuz, el perfil en aminoácidos de su proteína es similar al encontrado por Aguilera et al. (1992) y Cros et al. (1992a), siendo superiores los niveles de los aminoácidos azufrados, como se comenta para el caso de las habas (1,60 y 2,11%, para metionina y cisteína, respectivamente, frente a 0,4-0,8 %).

El perfil en aminoácidos de la fracción proteica no degradable de las habas, determinado en vacas después de la incubación en rumen durante 16 horas (Cros et al., 1992b), y en ovejas tras la incubación en el rumen durante 72 horas (Sanz Sampelayo et al., 1999), es distinto al obtenido en el presente trabajo, tras la incubación en el rumen de cabras durante 48 horas. En general, los cambios debidos a la incubación en el rumen de las semillas de habas, observados por Cros et al. (1992b) son de menor grado que los detectados en este estudio siendo, por el contrario, mayores los determinados por Sanz Sampelayo et al. (1999). Los autores citados coinciden en señalar que se produce un gran cambio en la concentración de arginina, que experimenta una disminución, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio. Cros et al. (1992b) observaron que cisteína, arginina y lisina fueron los aminoácidos más degradables en la proteína de habas, mientras que treonina, glicina y



leucina resultaron más resistentes a la degradación ruminal, lo que contradice nuestras observaciones.

En cuanto a la fracción no degradable de la proteína del altramuz, la composición en aminoácidos fue distinta de la obtenida por Cros et al. (1992a). Sin embargo, estos autores coinciden con los resultados de este estudio en destacar que los mayores cambios, tras la incubación en el rumen, son los producidos en la concentración del glutámico y la arginina, que disminuyen. Además, Cros et al. (1992a) observan que arginina, glutámico y tirosina son los aminoácidos más degradables de la proteína de altramuz, mientras que isoleucina, lisina, metionina y alanina son los menos degradables, resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Sin embargo, Benchaar et al. (1994) observaron que como consecuencia de la incubación de la semilla de altramuz en el rumen de vacuno durante 16 horas, los aminoácidos más degradables fueron la arginina y los aminoácidos azufrados, mientras que los menos degradables correspondieron a la histidina, lisina y glicina, resultados que difieren de los del presente estudio.

Con respecto a yeros y veza, el perfil en aminoácidos, determinado por Aguilera et al. (1992), se asemeja al obtenido en este estudio, excepto para la metionina y la cisteína que, al igual que en las habas y el altramuz, presentan valores superiores a los observados en la bibliografía. Hadjipanayiotou y Economides (2001) también determinaron el perfil en aminoácidos de la proteína de la veza, resultados que, en general, difirieron de los del presente estudio. No se ha encontrado información sobre el perfil aminoacídico de la fracción de la proteína no degradable de estas dos leguminosas.

En general, las tendencias de cambio que aparecen en la bibliografía en cuanto a la degradabilidad de los aminoácidos de las distintas leguminosas, se reflejan en este estudio. Diferentes autores señalan que los aminoácidos ramificados (valina, isoleucina, leucina) son los más resistentes a la degradación en el rumen (Rulquin y Verité, 1993; O'Mara et al., 1997; Ceresnakova et al. 2002), por lo que su porcentaje en la fracción no degradable no cambia en gran medida, como se deduce en este estudio. En cuanto a la arginina, muchos autores coinciden en que se trata de uno de los aminoácidos que más se degrada (Le Henaff, 1991; Cros et al., 1992a y b; Sanz Sampelayo et al., 1999; O'Mara et al. 1997) al igual que ha ocurrido en nuestro estudio. O'Mara et al. (1997) y Ceresnakova et al. (2002) también señalaron la tendencia a una mayor desaparición en el rumen del glutámico, aspecto que también se ha observado en este trabajo.

Para comparar el cambio global en la composición en aminoácidos que sufre cada fuente proteica, como consecuencia de su incubación en el rumen, se realizó un análisis multivariante, empleando como método de extracción de factores el de componentes principales y el método de rotación varimax. Considerando la fracción de varianza explicada por cada factor, se tuvieron en cuenta para el análisis los tres primeros derivados (Tabla 13), que explicaban un 28,4% (primer factor), 26,7%

(segundo factor) y 24,4% (tercer factor) de la varianza total. En la Tabla 13, también aparece la matriz de componentes rotados en la se observa que, de acuerdo con la carga de cada variable en cada factor, el primero estaba determinado de manera positiva principalmente por la concentración de glicina, tirosina e histidina. El segundo factor quedaba fundamentalmente definido por la concentración de serina, de manera positiva. El tercer factor estaría determinado, también de manera positiva, por las concentraciones de isoleucina, fenilalanina y alanina y, negativamente, por la de aspártico. En la figura 4, se representa la posición de las diferentes leguminosas, según el perfil aminoacídico de su proteína, antes y después de la degradación ruminal así como la situación de los distintos aminoácidos con respecto a los factores 1 y 2. Se observan dos tipos de cambios: el que experimenta el altramuz en el sentido positivo del factor 2, y el que sufren habas, veza y yeros, también en sentido positivo, pero con respecto al factor 1.

Tabla 13. Valores de los aminoácidos de las leguminosas originales y de su fracción no degradada en el rumen. Resultados del análisis multivariante factorial.

Variable	Matriz de componentes rotados		
	1	2	3
Gli	0,956	-0,211	0,092
Tir	0,931	0,132	0,054
His	0,858	0,384	0,073
Cid	0,746	0,616	0,106
Pro	-0,679	-0,362	0,059
Ser	0,126	0,932	0,032
Arg	-0,462	-0,777	-0,066
Tre	-0,075	0,768	0,356
Met	0,156	0,704	0,487
Glu	-0,617	-0,661	-0,357
Ile	-0,323	0,2	0,885
Fen	0,047	0,295	0,848
Ala	0,342	0,425	0,806
Asp	-0,485	0,047	-0,804
Val	0,201	0,637	0,667
Leu	-0,387	-0,225	0,614
Lis	-0,054	0,224	-0,053
Factor	Varianza explicada (%)		Varianza explicada acumulada (%)
1	28,4		28,4
2	26,7		55,1
3	24,4		79,5

Rulquin y Verité (1993) realizaron un análisis multivariante similar, obteniendo resultados contrarios al del presente estudio. Estos autores observaron que las diferencias en el perfil aminoacídico entre la proteína del alimento original y su correspondiente fracción no degradable pueden considerarse pequeñas, en comparación con las grandes diferencias observadas entre alimentos, por lo que concluyen que el perfil en aminoácidos del alimento puede tomarse como guía inicial para estimar el perfil de la fracción no degradable. Sin embargo, otros autores exponen que el cambio de la composición aminoacídica, debido a su degradación en el rumen, depende de la

fuelle proteica por lo que no puede considerarse el perfil aminoacídico del alimento original para predecir el de la fracción no degradable en rumen (Erasmus et al., 1993; Cozzi et al., 1994; Sanz Sampelayo et al., 1999). Sanz Sampelayo et al. (1999), a partir de los resultados derivados de un análisis multivariante similar al realizado en este estudio en el que consideraron cuatro fuentes proteicas distintas concluyen, además, que siendo el perfil aminoacídico muy diferente entre habas y torta de girasol, la composición en aminoácidos de sus correspondientes fracciones no degradables fue muy parecida, observando este mismo resultado con semilla de algodón y gluten de maíz.

Los resultados del presente estudio, indican que el perfil en aminoácidos de la proteína de las diferentes leguminosas grano era parecido. Sin embargo, el perfil aminoacídico de sus fracciones proteicas no degradables era muy diferente. El grado de modificación del perfil en aminoácidos de cada fuente proteica tras la degradación en el rumen, está determinado por la magnitud del vector que une la posición de cada leguminosa, antes y después de la degradación ruminal (Figura 4). De acuerdo con lo anterior, el orden de las leguminosas según la intensidad del cambio experimentado por la fermentación ruminal es el siguiente: habas, altramu, yeros y veza. Por tanto, podría indicarse, claramente, que la fracción de la proteína de las leguminosas grano que no se degrada en el rumen diferiría en su potencial como fuente de aminoácidos absorbibles en el intestino, tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, respecto del potencial que representarían las fuentes proteicas originales.

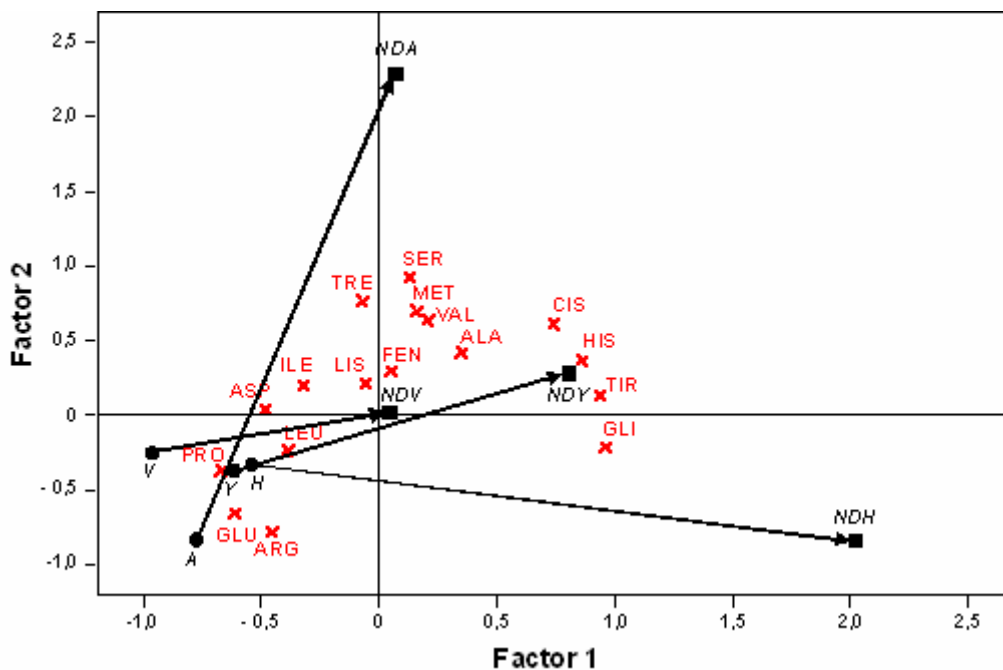


Figura 8. Efecto de la incubación ruminal sobre el perfil aminoacídico de las leguminosas H, V, A, Y, corresponden a la proteína de habas, veza, altramu y yeros, respectivamente, mientras que NDH, NDV, NDA, NDY, corresponden con la fracción de la proteína no degradada, tras incubación ruminal durante 48 horas, de habas, veza, altramu, y yeros, respectivamente.

En ensayos de infusión postruminal de aminoácidos en vacas lecheras, utilizando diversos tipos de dietas, se ha demostrado que incremento en el aporte de aminoácidos o de la concentración de aminoácidos esenciales, aumenta significativamente la producción de leche y de las proteínas de esta (Murphy y O'Mara, 1993). Aunque la composición de la proteína ideal para la producción de leche no está establecida, es probable que sea muy similar a la que presenta la leche (Schingoethe, 1996b). Los aminoácidos que tradicionalmente se han considerado limitantes para la producción de leche son la metionina y la lisina (Murphy y O'Mara, 1993), aunque el efecto de la suplementación con estos aminoácidos se hace más patente cuando se adicionan de manera conjunta. Para estudiar los aminoácidos que más limitan la producción de leche en base a una dieta concreta, Cros et al. (1992) compararon el perfil en aminoácidos de diferentes fracciones proteicas (alimento original, fracción no degradable en el rumen, fracción no digestible en el intestino) con el perfil aminoacídico de la proteína de la leche, concluyendo que los aminoácidos más limitantes variaban según la composición de la fracción de la proteína considerada. No obstante el perfil en aminoácidos de la fracción de proteína no degradable en el rumen que se absorbe en el intestino, se considera el indicador más adecuado con vistas a la producción de proteína láctea, dependiendo su valor de la mayor o menor similitud con la composición aminoacídica de la leche. De acuerdo con esto y comparando la composición de la digesta duodenal con la de la leche, Cros et al. (1992b) concluyeron que al utilizar dietas basadas en habas para vacas en lactación, el orden de aminoácidos limitantes sería: aminoácidos azufrados, lisina, fenilalanina, tirosina y valina. En un estudio similar, estos mismos autores (Cros et al., 1992a) observaron que con el empleo de dietas que incluían altramuz, los aminoácidos más limitantes serían: aminoácidos azufrados, valina, lisina y leucina. Además, observaron que, aún cuando la composición en aminoácidos de las fracciones estudiadas era diferente, parte de los aminoácidos considerados limitantes se mantenía prácticamente en las tres fracciones.

Dado que los cambios que se producen en la composición aminoacídica de la digesta a nivel intestinal podrían considerarse mínimos, el perfil aminoacídico de la proteína después de la degradación ruminal podría también considerarse adecuado para predecir el de la proteína que sería absorbida en el intestino, tanto si se trata de alimentos que presentan un alta digestibilidad intestinal como de otros de digestibilidad menor (O'Mara et al., 1997). Por ello, realizamos una comparación similar a la descrita por Cros et al. (1992a y b) entre el perfil en aminoácidos esenciales de la proteína original de cada leguminosa, el de su fracción no degradable en el rumen y el de aminoácidos esenciales de la leche de cabra, obtenido por Posati y Orr (1976) (Tabla 14).

Tabla 14. Perfil en aminoácidos esenciales (% del total de AAE) de la proteína de la leche de cabra (Posati y Orr, 1976) y porcentaje de aminoácidos esenciales, en relación a los de la leche, de la proteína original y de su fracción no degradable en el rumen de las leguminosas grano.

AAE	Leche cabra	Original				Fracción no degradable en rumen			
		Habas	Altramuz	Yeros	Veza	Habas	Altramuz	Yeros	Veza
Lis	17,5	97,3	71,7	101,1	100,4	93,9	92,9	90,7	72,0
His	5,4	119,1	142,7	137,3	146,1	235,4	199,2	191,6	152,8
Tre	9,8	71,6	74,3	70,5	72,3	49,6	111,3	106,7	77,0
Arg	7,2	281,5	373,4	280,8	228,2	234,1	136,4	196,5	233,2
Val	14,5	67,5	65,5	67,0	73,0	76,0	83,9	70,3	85,7
Ile	12,5	66,3	71,8	67,3	73,6	67,4	69,6	65	78,4
Leu	19,0	78,6	76,8	78,9	76,5	73,1	68,1	74,4	74,2
Fen	9,4	101,1	98,5	99,5	112,7	104,5	105	112,8	110,7
Met	4,8	143,3	71,3	112,8	130	127,7	180,7	129,8	170,8

Según esta comparación, se podría considerar que, en general, el orden de aminoácidos limitantes de habas, yeros, altramuz y veza para la producción de leche, sería: isoleucina, leucina, valina, y lisina. Además, en las habas y la veza, la treonina resultaría limitante para la producción de leche. Estos resultados también ponen de manifiesto que mientras que ciertos aminoácidos podrían ser limitantes para la producción de leche en base al perfil aminoacídico de los alimentos originales, no lo serían si se tiene en cuenta el perfil de aminoácidos de la fracción no degradable. Valina, isoleucina y leucina, se muestran limitantes, tanto en el alimento original como en la fracción no degradable, lo que sería lógico puesto que, como se señaló anteriormente, el perfil de estos aminoácidos es poco sensible a la degradación en el rumen. Cabe destacar que aunque, en general, hay coincidencia con los resultados de Cros et al. (1992a y b), se deduce que la proteína de las leguminosas empleadas en este estudio no parece resultar limitante en cuanto al contenido de aminoácidos azufrados, al contrario de lo que se expone en la bibliografía.

Asumiendo que la composición en aminoácidos de la proteína de la leche es indicativa del balance de aminoácidos ideal para los rumiantes de alta producción. Schingoethe (1996a) propone como indicador de la calidad de la proteína el índice MPS (milk protein score). Este índice se calcularía como el cociente entre el contenido de los aminoácidos considerados más limitantes de la proteína suplemento y la cantidad de estos aminoácidos en la leche. Según este autor, los aminoácidos que probablemente resultan más limitantes para la síntesis de proteína en la leche, además de metionina y lisina, serían la histidina y los aminoácidos ramificados. Teniendo en cuenta lo expuesto por Schingoethe (1996a) se podría calcular el MPS para las distintas fuentes proteicas evaluadas en este estudio (Tabla 15).

Tabla 15. Perfil en aminoácidos considerados limitantes para la síntesis de proteína en leche (% del total de AAE) de la proteína de la leche de cabra (Posati y Orr, 1976) y de la proteína original y de su fracción no degradable en el rumen de las leguminosas grano. Cálculo del índice MPS.

	Leche	Habas		Altramuz		Yeros		Veza	
	Cabra	Original	ND	Original	ND	Original	ND	Original	ND
Met	4,83	6,92	6,17	3,44	8,73	5,45	6,27	6,27	8,24
His	5,37	6,40	12,64	7,67	10,70	7,37	10,29	7,85	8,20
Lis	17,50	17,02	16,44	12,55	16,25	17,70	15,88	17,57	12,59
Val	14,48	9,78	11,01	9,49	12,15	9,71	10,18	10,58	12,41
Ile	12,49	8,28	8,42	8,97	8,69	8,41	8,12	9,19	9,79
Leu	18,95	14,89	13,86	14,55	12,91	14,95	14,11	14,50	14,07
Total aa	73,63	63,28	68,54	56,67	69,43	63,59	64,84	65,96	65,31
MPS		0,86	0,93	0,77	0,94	0,86	0,88	0,89	0,89

MPS: milk protein score. ND: fracción no degradada en el rumen.

El índice MPS indica que las leguminosas presentarían una calidad similar en cuanto a ciertos aminoácidos considerados limitantes. Además, se observa que dicha calidad mejora tras la incubación en el rumen, para la proteína de las habas y del altramuz.

No obstante, la información aportada en este trabajo con respecto a la calidad de las leguminosas en cuanto a aminoácidos limitantes para la producción de leche, es relativa, puesto que solo disponemos de perfil aminoacídico de la fuente de proteína original y de la fracción no degradada en el rumen. El catabolismo de los aminoácidos en el intestino y en el hígado y la partición de los aminoácidos hacia el anabolismo en el músculo, parecen ser los factores de mayor limitación sobre la disponibilidad de los aminoácidos para la síntesis en la glándula mamaria (Bequette et al. 2003).

Puesto que el principal objetivo de este trabajo era la valoración de fuentes de proteína como alternativas tanto a la harina de carne como a la harina de soja, dada la prohibición de la primera consideramos interesante realizar una comparación de los diferentes aspectos estudiados con los de la soja. Los datos bibliográficos reflejan que el perfil en aminoácidos de la soja (Aguilera et al., 1992; Hadjipanayiotou y Economides, 2001) es similar al de las leguminosa grano empleadas en este estudio, siendo ambos, en principio, de buena calidad. La proteína de soja es rica en lisina, siendo la metionina, valina e isoleucina el primero, segundo y tercer aminoácido limitante, respectivamente, para la producción de leche (Rebollar y Blas, 2002), características parecidas a las de las leguminosas grano. Sin embargo, tanto la semilla de soja como las de leguminosas grano presentan una degradabilidad de la proteína en el rumen muy elevada, al contrario que la harina de soja, de acuerdo con el tratamiento que conlleva su obtención.

#### 4.4. DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DE LA PROTEÍNA NO DEGRADADA EN EL RUMEN.

Los Nuevos Sistemas de Valoración Proteica de Alimentos para Rumiantes, consideran de gran relevancia la estimación de la digestibilidad intestinal de la proteína de la dieta que no se degradada en el rumen (DIPNDR). En este trabajo, se aplican dos metodologías (*in situ-in vitro* e *in vitro*) con objeto de evaluar la idoneidad de estas técnicas y en un intento de simplificación de los procedimientos alternativos a los ensayos *in vivo*.

En la Tabla 16 se presentan los resultados obtenidos mediante la técnica *in situ-in vitro* (Calsamiglia y Stern, 1995) e *in vitro* (McNiven et al., 2002): la degradación ruminal de la proteína (DRPB) tras 16 horas de incubación en el rumen y tras 24 horas de incubación en solución de proteasa, para la técnica *in situ-in vitro* e *in vitro*, respectivamente, la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR) y la digestibilidad total de la proteína bruta (DTPB) de las leguminosas grano y de las dietas experimentales.

Tabla 16. Degradación ruminal (DRPB, %), digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR, %) y digestibilidad total (DTPB, %) de la proteína bruta de las leguminosas grano y las dietas completas.

	DRPB		DIPNDR		DTPB	
	Calsamiglia y Stern (1995)	McNiven et al. (2002)	Calsamiglia y Stern (1995)	McNiven et al. (2002)	Calsamiglia y Stern (1995)	McNiven et al. (2002)
Habas	87,6	56,0	54,0	86,7	98,6	94,1
Yeros	96,0	43,9	46,2	85,7	98,9	92,0
Altramuz	89,6	71,3	93,5	89,4	99,9	97,0
Veza	88,2	43,5	63,0	82,2	98,8	89,9
Dieta <sup>1</sup> Habas	68,1	49,3	82,3	76,4	99,3	88,0
Dieta <sup>1</sup> Yeros	73,6	47,3	72,4	75,7	98,8	87,2
Dieta <sup>1</sup> Altramuz	69,1	53,1	86,9	71,3	99,5	86,5
Dieta <sup>1</sup> Veza	69,5	46,5	66,9	69,0	98,5	83,4

<sup>1</sup>Las dietas habas, yeros, altramuz y veza, son aquellas en las que el 30% de la proteína estaba aportada por estas leguminosas.

Cabe destacar la disparidad encontrada entre los valores obtenidos aplicando ambas metodologías en todos los parámetros, tanto para las leguminosas grano como para las dietas experimentales. Si se comparan los valores de la digestibilidad total de la proteína bruta, estimados mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995), con los obtenidos a partir de la técnica de McNiven et al. (2002) se obtiene una correlación no significativa ( $P > 0,05$ ) y una relación relativamente débil entre ambas variables ( $r^2$ : 0,214) (Figura 9). Por otro lado, si se comparan los valores de digestibilidad intestinal de la proteína no degradada mediante ambas metodologías, considerando o no los valores del altramuz (Figura 10), que son los que no siguen el mismo patrón que el

resto de las leguminosas para las dos técnicas, se observa: 1) una correlación no significativa ( $P > 0,05$ ) y extremadamente débil ( $r^2: 0,0552$ ) teniendo en cuenta todos los valores; 2) una correlación significativa ( $P < 0,05$ ) y relativamente elevada ( $r^2: 0,5789$ ) entre ambas metodologías, sin tener en cuenta los valores correspondientes al altramuz. Sin embargo, no podríamos afirmar que los valores obtenidos para la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen de la semilla de altramuz fueran erróneos puesto que, como se comentará posteriormente, la bibliografía al respecto aporta valores muy variables (55-94%) (Cros et al., 1992a; Goelema et al., 1998; Solanas et al., 2005).

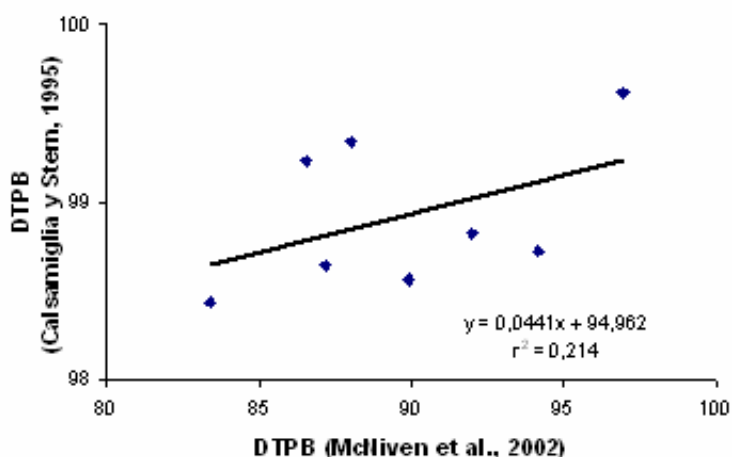


Figura 9. Relación lineal entre los valores de digestibilidad total de la proteína bruta (DTPB, %) estimados mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995), tras 16 horas de incubación ruminal en caprino, y la DTPB estimada a partir de la técnica de McNiven et al. (2002), tras incubación en proteasa durante 24 horas.

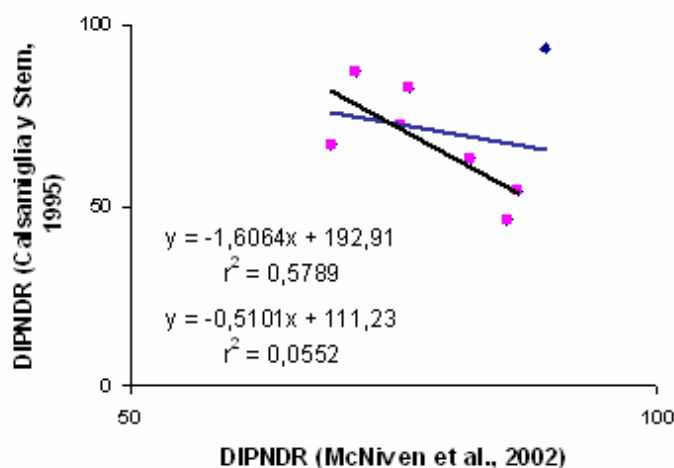


Figura 10. Relación lineal entre los valores de digestibilidad de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR, %) estimados mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995), tras 16 horas de incubación ruminal en caprino, y la DIPNDR estimada a partir de la técnica de McNiven et al. (2002), tras incubación en proteasa durante 24 horas.



Aunque la técnica *in situ* o de los sacos móviles (Hvelplund, 1985), que emplea animales canulados en rumen e intestino, proporciona estimaciones de la digestibilidad de la proteína que presentan buena correlación con las obtenidas *in vivo* (Hvelplund et al., 1994), el coste y la imprevisibilidad de los animales intervenidos quirúrgicamente, así como la salud de los mismos, han hecho que se desarrollen otros métodos (Antoniewicz et al., 1992; Calsamiglia y Stern, 1995; McNiven et al., 2002). Sin embargo, hay que tener en cuenta que estos métodos no consideran los factores que pueden influir sobre la tasa de degradación de la proteína en el rumen y la digestión intestinal, como la naturaleza del alimento o el contenido en proteína y fracciones proteicas (Stern et al., 1994). En este estudio se han empleado la metodología en tres fases descrita por Calsamiglia y Stern (1995) y la técnica *in vitro* de McNiven et al. (2002), que es una modificación del procedimiento anterior. Estos autores demostraron la buena correlación de los resultados obtenidos mediante la aplicación de ambas técnicas con los derivados de la metodología de los sacos móviles. Recientemente, Mesgaran y Stern (2005) estimaron la digestibilidad intestinal de la proteína de varios alimentos, mediante la técnica de los sacos móviles (Hvelplund, 1985), la metodología descrita por Calsamiglia y Stern (1995) y la de McNiven et al. (2002). Estos autores observaron una gran variación en la desaparición de la proteína en el rumen e intestino de los alimentos evaluados por los distintos métodos, presentando una correlación débil. La mejor correlación fue la establecida entre la digestibilidad total de la proteína, estimada mediante las técnicas de Calsamiglia y Stern (1995) y de McNiven et al. (2002) ( $r^2=0,66$ ), ligeramente superior a la obtenida en este trabajo. Además, observaron que los valores de digestibilidad total de la proteína, estimados mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995), fueron mayores que los obtenidos por las otras metodologías, resultados que están de acuerdo con los de este estudio. No obstante, el grado de relación entre métodos de estimación puede variar en función del alimento evaluado (Yáñez Ruiz et al., 2004).

En general, se obtienen valores elevados para la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR), tanto de las leguminosas como de las dietas experimentales. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995) difieren entre leguminosas (46,2-93,5%) y entre dietas (66,9-86,9%) mientras que los derivados de la técnica de McNiven et al. (2002) son más homogéneos (82,2-89,4% y 69,9-76,4% para leguminosas y dietas, respectivamente). La digestibilidad total de la proteína bruta (DTPB) es también elevada, presentando unos valores comprendidos entre 98,6-99,9 y 98,5-99,3 para las leguminosas y dietas, respectivamente, obtenidas mediante la técnica de Calsamiglia y Stern (1995) y de 89,9-97,0 para las leguminosas y de 83,4-88,0 para las dietas, mediante la técnica de McNiven et al. (2002).

La información bibliográfica referente a la digestibilidad de la fracción no degradable de las leguminosas grano es escasa y variable. Con respecto a yerros y veza, se reduce a valores de ADIN (nitrógeno insoluble en solución ácido detergente).

Además, parece que la metodología de McNiven et al. (2002), puesto que es relativamente reciente, no se ha aplicado a muchos alimentos siendo la más empleada la técnica in situ o de los sacos móviles (Hvelplund, 1985).

Aguilera et al. (1992) estimaron la digestibilidad intestinal de la proteína de habas, yeros, altramuz y veza, a partir del contenido en nitrógeno insoluble en solución ácido detergente (ADIN), que se asume que es una fracción no digestible en el intestino. Estos autores obtuvieron unos valores para ADIN (en % del nitrógeno total de las leguminosas) de 1,32, 1,68, 1,86 y 1,09 %, para habas, yeros, altramuz y veza, respectivamente, suponiendo una digestibilidad total de la proteína de 75,78, 57,79, 71,43, 76,71 %, para habas, yeros, altramuz y veza, respectivamente, valores inferiores a los de este estudio. Sin embargo, algunos autores indican que el ADIN, podría no ser completamente indigestible para determinados alimentos (Yáñez Ruiz et al., 2004).

Cros et al. (1992b) estudiaron la digestibilidad intestinal de la proteína de las habas, crudas o tratadas, en vacas canuladas en el rumen e intestino proximal. Estos autores obtuvieron que la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen fue de 93%, mientras que la digestibilidad total fue extremadamente elevada (99%), resultados que se aproximan a los obtenidos en este trabajo mediante la técnica de McNiven et al. (2002). Estos autores, realizaron un estudio similar para el altramuz (Cros et al., 1992a) concluyendo que la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen fue del 55%, mientras que la digestibilidad total fue del 98%, valores inferiores y superiores, respectivamente, a los obtenidos en este estudio. Además, Cros et al. (1992a y b) determinaron la digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales, tanto para las habas como para el altramuz, observando ciertas similitudes entre las semillas. Sin embargo, también detectaron diferencias, sobre todo en cuanto a los aminoácidos menos digestibles, que pondrían de manifiesto la necesidad de la estimación de la digestibilidad intestinal de los aminoácidos individuales para la proteína del alimento. Esta información, permitiría la selección de proteínas de elevada digestibilidad para aquellos aminoácidos que probablemente fueran más limitantes para la producción. Por ello, la caracterización de la digestibilidad intestinal de los aminoácidos de la proteína de las leguminosas consideradas en este estudio, podría ser un objetivo futuro para completar los alcanzados en este trabajo. Benchaar et al. (1994) también obtienen valores elevados para la digestibilidad total de la proteína del altramuz (97,6 %) utilizando vacas en lactación canuladas en rumen e intestino, resultados que están de acuerdo con los de este estudio. Sin embargo, estos autores obtienen resultados que difieren de los de Cros et al. (1992a) para la digestibilidad de los aminoácidos individuales, indicando la necesidad de profundizar en este tipo de estudios.

Goelema et al. (1998) también emplearon vacas canuladas en rumen e intestino, para la estimación de estos parámetros en guisantes, habas y altramuz, crudos o tratados. Estos autores obtienen valores muy elevados, tanto para la digestibilidad

intestinal de la proteína no degradada en el rumen (96,0 y 94,0 %, para habas y altramu, respectivamente), como para la digestibilidad total de la proteína bruta (99,1 y 98,5 %, para habas y altramu, respectivamente). Los resultados obtenidos en este estudio son parecidos a los estimados por Goelema et al. (1998), excepto los derivados de la técnica de Calsamiglia y Stern (1995) para la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen de las habas, que son más bajos. Recientemente, Solanas et al. (2005) estimaron la digestibilidad intestinal de la proteína de ciertas leguminosas grano mediante la técnica de los sacos móviles en vacuno. En general, obtuvieron valores elevados, siendo para el altramu de 82,9%, mientras que la semilla de soja y la harina de soja presentaron valores de 66,3 y 97,2 %, respectivamente, poniéndose de manifiesto los efectos del tratamiento con calor.

Por tanto, aunque existe variación entre las estimaciones de la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen y la digestibilidad total de la proteína bruta, en función del método empleado, en general, estos parámetros se pueden considerar elevados para las leguminosas y las dietas experimentales. Esto supondría un aspecto ventajoso de este tipo de fuentes de proteína, puesto que la proteína que no se degrada en el rumen, altamente digestible, contribuiría al pool de aminoácidos para la síntesis de proteína de la leche y para retención corporal.

#### 4.5. INGESTA, EXCRECIÓN FECAL Y DIGESTIBILIDAD APARENTE DE LOS DISTINTOS NUTRIENTES Y DE LA ENERGÍA. CONTENIDO EN PROTEÍNA Y ENERGÍA DIGESTIBLE DE LAS DIETAS EXPERIMENTALES.

Los valores de ingesta, excreción fecal y coeficientes de digestibilidad aparente de los distintos nutrientes y de la energía de las dietas experimentales, así como su contenido en energía y proteína digestible, aparecen en la Tabla 17.

Tabla 17. Ingesta (g MS/día), excreción fecal (g MS/día) y digestibilidad aparente (%) media de los distintos nutrientes de las dietas experimentales y de la energía. Contenido en energía (MJ/kg MS) y proteína digestible (g/kg) de las dietas.

	Dietas <sup>1</sup>					Significación Estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza	DER	
<b>MS</b>						
Ingesta	1511,49	1508,60	1468,77	1512,15	134,29	NS
Excreción fecal	391,94	411,40	373,89	408,31	57,12	NS
Digestibilidad	74,25	72,75	74,67	73,09	2,20	NS
<b>MO</b>						
Ingesta	1417,81	1417,62	1386,70	1419,24	119,68	NS
Excreción fecal	345,46	365,84	330,18	360,86	47,33	NS
Digestibilidad	75,79	74,20	76,28	74,64	2,07	NS
<b>Proteína</b>						
Ingesta	269,16	263,96	258,72	264,45	25,24	NS
Excreción fecal	58,14	60,69	58,09	60,61	9,21	NS
Digestibilidad	78,60	76,92	77,61	77,18	1,98	NS
<b>Grasa</b>						
Ingesta	45,23 <sup>a</sup>	44,52 <sup>a</sup>	54,60 <sup>b</sup>	40,76 <sup>c</sup>	2,78	***
Excreción fecal	7,14	7,36	8,66	7,10	1,31	NS
Digestibilidad	84,35	83,49	84,20	82,68	2,29	NS
<b>Minerales</b>						
Ingesta	93,68	90,98	82,07	92,91	18,63	NS
Excreción fecal	46,48	45,56	43,70	47,45	10,75	NS
Digestibilidad	49,76	48,63	46,23	47,41	6,93	NS
<b>FND</b>						
Ingesta	616,28	631,47	574,46	626,14	61,26	NS
Excreción fecal	230,64	247,89	215,15	249,30	31,07	NS
Digestibilidad	62,70	60,75	62,65	60,25	3,42	NS
<b>FAD</b>						
Ingesta	209,23	199,77	199,70	216,82	41,15	NS
Excreción fecal	156,18	164,50	144,08	168,09	20,90	NS
Digestibilidad	24,64	16,69	25,63	21,74	8,98	NS
<b>Energía</b>						
Ingesta	28,45	28,43	27,94	28,51	2,45	NS
Excreción fecal	7,60	8,03	7,34	7,97	1,04	NS
Digestibilidad	73,46	71,76	73,82	72,11	2,20	NS
Energía Digestible	13,84	13,53	14,05	13,61	0,46	NS
Proteína Digestible	138,75	134,42	135,13	134,99	6,27	NS

Dentro de una misma fila los valores medios afectados por letras diferentes resultan estadísticamente distintos ( $P < 0,05$ ). <sup>1</sup> Dietas habas, yeros, altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. DER: Desviación Estándar Residual; NS: No significativo; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

Para la valoración del aprovechamiento digestivo de un alimento es esencial estimar la digestibilidad aparente de los distintos nutrientes y de la energía; esto implica la determinación tanto de la ingesta de esos parámetros como de su excreción fecal. En la Tabla 17, se observa que, partiendo del suministro de 1kg de concentrado y 1kg de forraje, por animal y día, el valor medio de la ingesta de materia seca es elevado (1,5 kg/ día), lo que refleja la aceptabilidad de las distintas dietas por los animales. Esto puede explicarse en base a diversos hechos: 1) en el rumiante, existe una relación positiva entre la ingesta y la velocidad de digestión y digestibilidad del alimento (McDonald et al., 1995). Por tanto, los valores elevados tanto de los coeficientes de digestibilidad de los distintos nutrientes como de la velocidad de degradación en el rumen, estimada para la materia seca y la proteína de las dietas experimentales (apartado 4.2), supondrían ingestas elevadas; 2) los nutrientes requeridos para una óptima actividad microbiana en el rumen (proteína) generalmente estimulan la ingestión de alimento, mientras que los nutrientes que alteran la funcionalidad del rumen (lípidos) la reducen (Faverdin, 1999). La selección del alimento por los rumiantes parece que se basa, principalmente, en la cantidad de proteína bruta que dicho alimento contiene, mostrando, generalmente, preferencia por dietas ricas en nitrógeno degradable de alta calidad (Faverdin, 1999), características que cumplen las cuatro dietas experimentales consideradas en este estudio. De acuerdo con estas observaciones Brun-Bellut et al. (1990) concluyeron que con el mismo contenido en proteína, menor cantidad de proteína degradable producía una marcada disminución de la ingesta en cabras.

La ingesta de nutrientes y energía así como la excreción fecal y las digestibilidades se mostraron similares ( $P > 0,05$ ), excepto para la grasa. La ingesta de grasa con la dieta que incluía altramuz (54,60 g MS/día), resultaba más elevada y diferente estadísticamente ( $P < 0,05$ ) de la de las otras dietas experimentales. Las ingestas de grasa para las dietas que incluían habas y yeros (45,23 y 44,52 g MS/día, respectivamente) eran similares ( $P > 0,05$ ) pero más elevadas que la correspondiente a la de la dieta que contenía veza (40,76 g MS/día). Las excretas fecales de grasa no presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ), aunque se detectó una tendencia ( $P = 0,08$ ) para la cual la excreción de grasa de los animales alimentados con la dieta que incluía altramuz resultaba más alta. En función de las correspondientes ingestas y excreciones fecales de grasa, los coeficientes de digestibilidad no resultaron diferentes ( $P > 0,05$ ) entre dietas. Además, cabe destacar que aunque los contenidos en energía digestible de las distintas dietas no eran estadísticamente diferentes ( $P > 0,05$ ), se detectaba una tendencia ( $P = 0,13$ ) de la dieta que incluía altramuz a presentar el valor más elevado con respecto a las dietas que incluían veza y yeros.

Aunque como ya se ha comentado, las ingestas de las dietas experimentales no son estadísticamente diferentes, se observa que la dieta que incluía altramuz presentaba una ingesta de materia seca, y en general de todos los nutrientes excepto de la grasa, ligeramente inferior a la de las otras dietas. Robinson y McNiven (1993), también

observaron una ingesta más baja, en vacas en lactación alimentadas con dietas suplementadas con altramuz, frente a aquellas alimentadas con harina de soja. Estos autores atribuyeron este hecho al potencial efecto negativo de la grasa de la dieta sobre la fermentación ruminal y, por tanto, sobre la ingesta de alimento. Esta explicación podría aplicarse a este estudio, puesto que la dieta que incluía altramuz presentaba un nivel de grasa superior al de las otras tres dietas. Además, Robinson y McNiven (1993) sugieren que la menor ingesta de la dieta suplementada con altramuz podría asociarse a las características de la FND que presenta la semilla de altramuz. La FND se encuentra mayoritariamente en la cascarilla y es lentamente degradada en el rumen, aumentando el volumen ruminal; por otro lado, la cascarilla de la semilla tiende a hincharse, ocupando más espacio a medida que se va humedeciendo. Por tanto, el mayor contenido de grasa y el mayor volumen ruminal, podrían influir en la ingesta de la dieta que incluía altramuz, aun cuando en este estudio la diferencia en el nivel de ingesta de esta dieta con respecto a las otras tres, es mínima y no significativa.

Aunque no se observaron diferencias significativas entre dietas con respecto a la digestibilidad de la fibra, otros autores (Kadzere y Jingura, 1993) encuentran valores inferiores con el aumento del contenido en grasa de la dieta. Estos autores emplearon cuatro dietas, elaboradas en base a semillas de soja, que presentaban unos porcentajes de grasa de 2,7, 3,1, 4,4 y 5,2%. Kadzere y Jingura (1993) observaron que la digestibilidad de la fibra bruta fue menor, y estadísticamente significativa, para las cabras alimentadas con las dietas que contenían 4,4 y 5,2% de grasa que para aquellos animales que consumieron las dietas cuyo contenido en grasa era de 2,7 y 3,1%. En dietas de rumiantes, una cantidad de grasa elevada, se asocia con propiedades microbicidas en el retículo-rumen, particularmente con la presencia de ácidos grasos insaturados de cadena larga. Sin embargo, en este estudio tanto la ingesta como la excreción fecal de la fibra, fueron menores para la dieta que incluía altramuz que para el resto de las dietas, de modo que el coeficiente de digestibilidad de la fibra resultó similar a los de las dietas que incluían habas, yeros y veza.

Diferentes autores señalan la alta digestibilidad que presentan las leguminosas grano en rumiantes (Varela et al., 1961; Hadjipanayiotou et al., 1985; Boza, 1991; Abreu y Bruno-Soares, 1998). Hadjipanayiotou et al. (1985) calcularon la digestibilidad aparente de varias leguminosas grano mediante la diferencia entre la digestibilidad de una dieta base y la de la misma dieta a la que se añadía el ingrediente adicional (leguminosa), aproximadamente en la misma cantidad que en el presente estudio. Obtuvieron valores de digestibilidad para la materia seca, la materia orgánica y la proteína de las leguminosas individuales de 82-89, 84-91 y 82-86%, respectivamente. Con respecto a las dietas completas las digestibilidades de la materia seca, materia orgánica y proteína presentaron valores medios de 79, 82 y 78%, respectivamente, resultando los obtenidos en este estudio, ligeramente menores. Los resultados de este trabajo, están de acuerdo con las observaciones expuestas anteriormente, reflejando la elevada digestibilidad de las dietas elaboradas en base a

leguminosas grano. Por otro lado y puesto que la digestibilidad de los alimentos está estrechamente relacionada con la composición química de los mismos (Bondi, 1989), se puede deducir que los coeficientes de digestibilidad de los distintos nutrientes son similares para las distintas dietas experimentales, debido a que la composición química de estas resulta similar, siendo isoenergéticas e isonitrogenadas, como se indicaba en el apartado 4.1 de esta memoria.

#### 4.6 UTILIZACIÓN METABÓLICA DEL NITRÓGENO PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE.

En la Tabla 18 se presentan los valores de la ingesta (NI), excreción fecal (NH) y urinaria (NO), y cantidades derivadas a leche (NL) del nitrógeno, así como el nitrógeno digestible (NI-NH), el balance de nitrógeno (BN = ND-NO) y el nitrógeno retenido (NR = BN-NL), expresados como  $\text{g/kg}^{0,75}\text{día}$ , para las distintas dietas experimentales. Las cantidades de nitrógeno disponible para la producción de leche (NP), se calcularon como la diferencia entre el nitrógeno ingerido y el necesario para mantenimiento en la raza granadina en lactación ( $0,478 \text{ g/kg}^{0,75}\text{día}$ ), de acuerdo con Aguilera et al. (1990). También se han calculado las relaciones entre algunos de estos parámetros, con el fin de deducir, la utilización de las distintas fracciones de nitrógeno, según la dieta consumida.

Tabla 18. Valores de ingesta y balance de nitrógeno ( $\text{g/kg}^{0,75}$  día). Relaciones indicativas de su utilización.

	Dietas <sup>1</sup>					Significación Estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza	DER	
NI	2,640	2,580	2,525	2,573	0,314	NS
NH	0,571	0,593	0,568	0,591	0,106	NS
NO	0,997	1,090	1,042	1,063	0,173	NS
ND	2,069	1,987	1,957	1,983	0,225	NS
BN	1,072	0,897	0,916	0,920	0,172	NS
NL	0,509	0,507	0,486	0,486	0,086	NS
NR	0,563 <sup>a</sup>	0,389 <sup>b</sup>	0,43 <sup>a,b</sup>	0,434 <sup>a,b</sup>	0,132	*
NP	2,162	2,102	2,047	2,095	0,314	NS
NH/NI	0,214	0,231	0,224	0,228	0,020	NS
NO/NI	0,381	0,422	0,412	0,413	0,054	NS
NB/NI	0,406 <sup>a</sup>	0,347 <sup>b</sup>	0,364 <sup>a,b</sup>	0,359 <sup>a,b</sup>	0,045	*
NL/NI	0,193	0,197	0,192	0,190	0,022	NS
NR/NI	0,213 <sup>a</sup>	0,150 <sup>b</sup>	0,172 <sup>a,b</sup>	0,169 <sup>a,b</sup>	0,045	*
ND/NI	0,786	0,769	0,776	0,772	0,020	NS
NO/ND	0,484	0,547	0,531	0,535	0,063	NS
BN/ND	0,516	0,453	0,469	0,466	0,063	NS
NL/ND	0,246	0,257	0,248	0,246	0,032	NS
NR/ND	0,271 <sup>a</sup>	0,196 <sup>b</sup>	0,221 <sup>a,b</sup>	0,219 <sup>a,b</sup>	0,058	*
NL/BN	0,478 <sup>a</sup>	0,570 <sup>b</sup>	0,533 <sup>a,b</sup>	0,530 <sup>a,b</sup>	0,073	*
NR/BN	0,522 <sup>a</sup>	0,430 <sup>b</sup>	0,467 <sup>a,b</sup>	0,470 <sup>a,b</sup>	0,073	*
NL/NP	0,236	0,243	0,238	0,234	0,028	NS
(NH+NO)/NL	3,148	3,375	3,412	3,454	0,509	NS

<sup>1</sup> Dietas habas, yeros, altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. DER: Desviación Estándar Residual; NS: No Significativo. \*:  $P < 0,05$ . Dentro de una misma fila, los valores medios afectados por letras diferentes resultan estadísticamente distintos ( $P < 0,05$ ).

Los valores medios de NR, así como de las relaciones establecidas entre BN/NI, NR/NI, NR/ND y NR/BN, para la dieta que incluía habas (0,563  $\text{g/kg}^{0,75}$  día, 0,213, 0,271, 0,522, respectivamente) resultaron estadísticamente superiores ( $P < 0,05$ ) a los correspondientes a la dieta que incluía yeros (0,389  $\text{g/kg}^{0,75}$  día, 0,150, 0,196, 0,430, respectivamente). Igualmente, se detectaba una tendencia ( $P = 0,18$ ) a la que el balance de nitrógeno de la dieta que incluía habas (1,072  $\text{g/kg}^{0,75}$  día) resultaba mayor que el de la que contenía yeros (0,897  $\text{g/kg}^{0,75}$  día). Por el contrario, la relación NL/BN correspondiente a la dieta que presentaba yeros (0,570), resultaba estadísticamente ( $P < 0,05$ ) más elevada que la de la dieta con habas (0,478), mostrándose la distinta partición del nitrógeno metabolizable hacia la retención corporal o la excreción en leche, según la dieta consumida. En la Figura 11 se representan las relaciones entre BN/NI así como las relaciones NL/BN y NR/BN para las cuatro dietas experimentales, que ponen de manifiesto lo anteriormente citado.



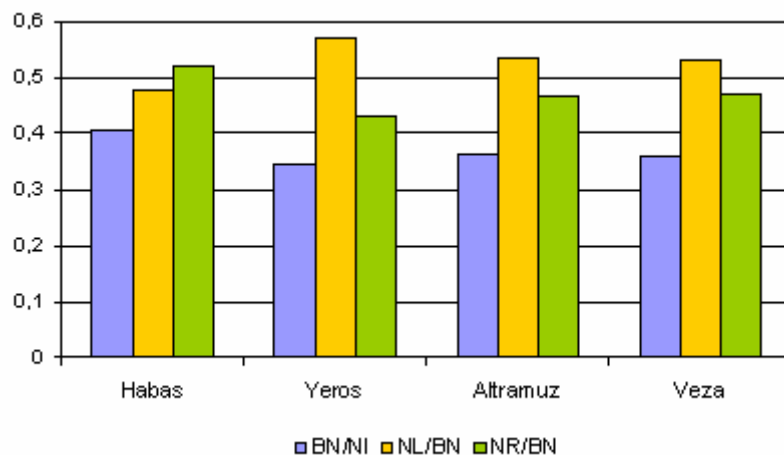


Figura 11. Relaciones establecidas entre el balance de nitrógeno respecto al ingerido (BN/NI) y el nitrógeno derivado a leche respecto al balance de nitrógeno (NL/BN) y el nitrógeno retenido con respecto al balance de nitrógeno (NR/BN), para las dietas que incluían habas, altramuz, yeros y veza.

La información disponible con respecto a la utilización de las leguminosas consideradas en este estudio es bastante escasa y, además, muy pocos estudios analizan la utilización del nitrógeno ingerido. Masson et al. (1981a, b) emplearon dietas isoenergéticas e isonitrogenadas, en cabras en lactación de raza alpina, que incluían en su composición diferentes leguminosas (habas, guisantes y altramuz) como sustitutos de la soja. Estos autores obtuvieron, una ingesta, producción de leche y contenido en proteína de la misma, similar para las distintas dietas, al igual que los resultados de este estudio. Esto indicaría que tanto el nitrógeno ingerido como el derivado a leche, no eran diferentes, según el tipo de leguminosa utilizada, lo que coincide con los resultados de este trabajo. En cabras de raza granadina, Sanz Sampelayo et al. (1998) utilizaron una dieta que incluía habas, como fuente principal de proteína, obteniendo unas relaciones entre el nitrógeno derivado a leche con respecto al ingerido y el nitrógeno derivado a leche con respecto al disponible para la producción, ligeramente más bajas (0,159 y 0,201 respectivamente) que las obtenidas en este estudio (0,193 y 0,236, para NL/NI y NL/NP, respectivamente).

Lindberg y Gonda (1996) establecen que las pérdidas del nitrógeno ingerido en la cabra en lactación son del orden del 43%, 29% y 24% de la pérdida total, para la excreción por orina, heces y leche, respectivamente. Para las pérdidas indicadas, excreción por orina, heces y leche, se obtuvieron los siguientes valores: 48,0, 27,5 y 24,5%, respectivamente para la dieta que incluía habas; 49,8, 27,1, y 23,2%, respectivamente para la dieta que incluía yeros; 49,7, 27,6 y 22,7%, respectivamente para la dieta con altramuz y 49,7, 27,6 y 22,7%, respectivamente, para la dieta que contenía veza. Los resultados de este estudio son similares a los indicados por Lindberg y Gonda (1996), excepto para la pérdidas de nitrógeno a través de la orina que resultaron ligeramente más altas, lo que se debería a la elevada degradabilidad en

el rumen (Schmidely et al., 1999; Reynal y Broderick, 2005) de las distintas leguminosas.

Como se indicó en el apartado 4.2 de esta memoria, dada la elevada degradabilidad de las leguminosas grano su valor proteico podría relacionarse con la síntesis de proteína microbiana (Guedes y Dias da Silva, 1996; González y Andrés, 2003). Para optimizar el proceso de síntesis de proteína microbiana, debe existir una relación adecuada entre proteína y carbohidratos y una sincronización de su degradación. En este aspecto, Schmidely et al. (1999) utilizaron una dieta que incluía en su composición, además de almidón, una fuente proteica rápidamente degradable, que determinaba una buena sincronización en la degradación ruminal de ambos constituyentes, frente a otra compuesta por una fibra altamente digestible y una fuente de proteína lentamente degradable, con una menor sincronización en cuanto a su degradación. Estos autores analizaron la utilización del nitrógeno para ambos tipos de dietas obteniendo, para la que aportaba la proteína rápidamente degradable, una mayor pérdida de nitrógeno por orina y, en consecuencia un balance más bajo. Las características de la dieta rápidamente degradable empleada por Schmidely et al. (1999) podrían considerarse próximas a las que presentan las dietas que se emplearon en este estudio, de modo que puede realizarse una comparación. En este trabajo se establecen unos balances de nitrógeno en relación con el ingerido similares a los que obtiene Schmidely et al. (1999) resultando, por el contrario, la partición del nitrógeno metabolizable hacia la excreción en leche o hacia la retención corporal, inferior y superior, respectivamente a lo obtenido por Schmidely et al. (1999).

De acuerdo con estos resultados, podemos asumir que, en cuanto a la utilización del nitrógeno, las dietas empleadas en este estudio se comportaron de una manera que corresponde con la de las fuentes proteicas incluidas, pareciendo existir una sincronización entre la degradabilidad ruminal de sus carbohidratos y proteínas. Como se ha comentado, las leguminosas grano presentan una elevada degradabilidad, tanto para la proteína como para los carbohidratos (Yu et al., 2002), lo que dependiendo del resto de componentes de la dieta, puede dar lugar a un exceso de producción de amonio en el rumen, perdiéndose el nitrógeno a través de la orina. Puesto que en este estudio se observa que tanto las leguminosas como las dietas experimentales presentan elevada degradabilidad, podrían producirse pérdidas de nitrógeno a través de la orina relativamente elevadas debido a un aporte de proteína degradable por encima de los requerimientos del animal. Estudios de Mishra y Rai (1996a, b) en los que emplearon dietas con diferentes cantidades de proteína degradable y no degradable en cabras en lactación, concluyeron que la mejor utilización del alimento para la producción de leche se obtenía cuando se aportaban las mayores cantidades de proteína no degradable. Por lo tanto, se deduce como vía de posible mejora en la composición de las dietas empleadas, la suplementación con una fuente proteica menos degradable o el tratamiento conveniente de las semillas con el fin de conseguir una menor degradabilidad de la proteína. Independientemente de ello, la relación entre proteína

no degradable y degradable a nivel del rumen para las distintas leguminosas y dietas experimentales, sería más elevada teniendo en cuenta la corrección para la pérdida de partículas.

Finalmente, se puede decir que el comportamiento de las dietas resultó diferente. La dieta que incluía habas alcanzaba, como consecuencia de una mayor ingesta y menor excreción por orina, un balance de nitrógeno que tendía a ser más elevado, sobre todo en comparación con el obtenido con la dieta que contenía yeros. De acuerdo con esto, la relación entre el balance de nitrógeno y el nitrógeno ingerido, la denominada “utilización neta de la proteína”, se detectaba estadísticamente más alta para la dieta con habas frente a la que incluía yeros, indicativo de la mejor calidad biológica de esa proteína. Sin embargo se deducía que la cantidad de nitrógeno metabolizable que derivaba a leche resultó menor para la dieta que incluía yeros frente a la de habas, mientras que la cantidad de nitrógeno metabolizable que se destinaba a la retención corporal fue mayor para la dieta que incluía yeros que para la que contenía habas. Por tanto, el mayor balance de nitrógeno obtenido con el consumo de la dieta que contenía habas no determinaba una mayor cantidad de nitrógeno en leche, sino que era destinado, en mayor medida, hacia la retención corporal.

Estos resultados parecen indicar que el patrón de composición de una proteína que determina su calidad con vistas a la retención corporal, puede ser diferente del que presentaría para la producción de leche. Bequette et al. (1997) emplearon una mezcla de 13 aminoácidos marcados para estudiar el flujo de aminoácidos plasmáticos y la partición de estos hacia la glándula mamaria en cabras en lactación. Como promedio, el 25% del flujo plasmático de aminoácidos fue dirigido hacia la glándula mamaria en diferentes cantidades: menos del 20% de His, Ser, Fen y Ala; de 20 a 30% de Arg, Tre, Tir y Leu; entre 30 y 40% de Pro, Ile, Lis y Val, poniéndose de manifiesto la particular partición de aminoácidos hacia la síntesis de proteína en la glándula mamaria. Por tanto, puede que la proteína disponible a nivel metabólico de la dieta que contenía habas, resultara deficiente en algún aminoácido para la producción de leche y no para la retención corporal, o que la de la dieta que incluía yeros, presentara una calidad superior con vistas a la producción de leche. En este estudio no se obtuvo la composición en aminoácidos de las dietas experimentales si no de las leguminosas que se incluían, antes y después de su incubación en el rumen. Si comparamos esta composición (Tabla 12), observamos que respecto al perfil aminoacídico de la materia original, las únicas diferencias que caben destacar son las referentes al porcentaje de metionina y cisteína, que son mayores en las habas que en los yeros. La fracción proteica no degradable, que aunque era pequeña pudo suplementar, a nivel intestinal, a la proteína microbiana presentaba una composición para los yeros más alta en lisina, treonina, fenilalanina y metionina, que la de las habas, aminoácidos considerados limitantes para la producción de leche (Murphy y O’Mara, 1993). Sin embargo, como se expuso en el apartado 4.3, se producen cambios en la composición de aminoácidos a

nivel de intestino e hígado que afectarían a la disponibilidad de los aminoácidos para la síntesis de proteína en la glándula mamaria.

#### 4.7. UTILIZACIÓN METABÓLICA DE LA ENERGÍA PARA LA PRODUCCIÓN DE LECHE

En la Tabla 19 se presentan los valores de la ingesta (IE), excreción por heces (EH), orina (EO) y metano (ECH<sub>4</sub>) y cantidades derivadas a leche (EL) de la energía, así como la energía digestible (ED = EB-EH) y energía metabolizable (EM = ED-(EO+ECH<sub>4</sub>)), expresadas como kJ/kg<sup>0,75</sup>.día, para las distintas dietas experimentales. Las cantidades de energía disponible para la producción de leche (EP) se calcularon como la diferencia entre la ingesta de energía metabolizable y la necesaria para mantenimiento para la raza granadina en lactación (401 kJ/kg<sup>0,75</sup>.día), de acuerdo con Aguilera et al. (1990). La pérdida energética, a través de la excreción por metano, se calculó a partir de las ecuaciones obtenidas por Aguilera y Prieto (1991) y Aguilera (2001) para la cabra granadina en lactación (10,32 KJ/ 100KJ de la energía digestible ingerida). También se han calculado las relaciones entre algunos de estos parámetros, con el fin de deducir la utilización de la energía en función de la dieta consumida. No se observaron diferencias significativas (P>0,05) entre los parámetros anteriormente descritos para las distintas dietas experimentales.

Tabla 19. Valores de ingesta y balance de energía (kJ/kg<sup>0,75</sup>.día). Relaciones indicativas de su utilización.

	Dietas <sup>1</sup>				DER	Significación Estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza		
IE	1745,42	1736,83	1705,18	1733,46	205,90	NS
EH	466,41	491,16	449,17	485,41	80,51	NS
EO	59,65	66,02	64,42	65,34	12,48	NS
ED	1279,01	1245,67	1256,01	1248,06	136,82	NS
ECH <sub>4</sub>	131,99	128,55	129,62	128,80	14,12	NS
EM	1087,37	1051,10	1061,97	1053,91	115,9	NS
EL	339,35	345,55	340,34	331,43	64,96	NS
EP	686,37	650,10	660,97	652,91	115,9	NS
EL/ED	0,265	0,277	0,271	0,265	0,043	NS
EL/EM	0,312	0,328	0,321	0,313	0,05	NS
EM/EB	0,624	0,606	0,625	0,609	0,021	NS
EL/EP	0,499	0,536	0,522	0,512	0,089	NS

<sup>1</sup> Dietas habas, yeros, altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. DER: Desviación Estándar Residual; NS: No significativo.

La energía digestible ingerida está estrechamente correlacionada con el consumo de materia seca o de materia orgánica digestibles, prefiriéndose esta última, puesto que de la primera forman parte minerales de nulo valor energético para el animal (Aguilera, 2001). Como se comentó en el apartado 4.5, la digestibilidad de la materia orgánica fue similar para todas las dietas experimentales, resultando, por tanto, la energía digestible también similar para las distintas dietas (1248-1279 kJ/kg<sup>0,75</sup>.día). Por otro lado, y puesto que la energía de la orina corresponde esencialmente a la de los compuestos

nitrogenados de la misma, se puede deducir que las pérdidas de nitrógeno a través de la orina, que fueron similares para las distintas dietas, dan lugar a pérdidas de energía a por medio de la orina que también son similares ( $59,65-66,02 \text{ kJ/kg}^{0,75} \cdot \text{día}$ ). Para expresar el valor nutritivo de un alimento en energía metabolizable en el rumiante, es necesario estimar las pérdidas energéticas derivadas de la formación de metano como resultado de la fermentación microbiana ruminal. La cuantificación del metano producido, podría estimarse a partir de la naturaleza de la dieta y de su ingesta. Algunos autores han demostrado la existencia de esta relación en distintos rumiantes (Blaxter y Clapperton, 1965; Neergaard, 1973; Moe y Tyrrel, 1979). Aguilera y Prieto (1991) relacionaron, mediante regresión lineal, la producción de metano con parámetros de composición nutritiva de la dieta consumida para cabras de raza granadina en lactación. De la revisión posterior de estas ecuaciones (Aguilera et al., 2001) obtuvieron que la producción de metano alcanza  $6,66 \text{ KJ}/100 \text{ KJ}$  de energía bruta ingerida (IEB) o  $10,32 \text{ KJ}/100 \text{ KJ}$  de energía digestible ingerida (IED); esta última expresión es la que se ha empleado en este trabajo para el cálculo de las pérdidas energéticas como metano y, posteriormente, de la energía metabolizable. La eficiencia de utilización de la energía metabolizable, tanto para mantenimiento y crecimiento como para secreción de leche y su composición y formación de proteína y grasa tisular, está determinada fundamentalmente por la naturaleza de la mezcla de los productos de la digestión que son absorbidos en el tracto digestivo. La determinación de la eficiencia con la que se utiliza la energía metabolizable para la producción de leche presenta dificultades, puesto que pueden darse procesos de deposición de grasa corporal o de movilización de reservas para atender a la lactación, cuyas eficiencias difieren de la que corresponde a la producción láctea. Aguilera (2001) obtiene que la eficiencia de utilización de la energía metabolizable para la lactación, cuando no existe deposición ni movilización de las reservas corporales, es de 66,7%. Si, además, se considera la deposición energética tisular concomitante la eficiencia de uso de la energía metabolizable para la lactación es muy semejante, 65,7%.

Como se comentó en el apartado anterior, la información disponible con respecto a la utilización de las leguminosas consideradas en este estudio es bastante escasa, y además muy pocos estudios analizan la utilización de la energía ingerida. En cabras de raza granadina, Sanz Sampelayo et al. (1998) utilizaron una dieta que incluía habas, como fuente principal de proteína, obteniendo unas relaciones entre la energía derivada a leche y la ingesta de energía metabolizable y, entre la energía derivada a leche y la disponible para la producción (0,304 y 0,582, respectivamente) próximas a las obtenidas en este estudio (0,312 y 0,499, para EL/EM y EL/EP, respectivamente).

Con respecto a la ingesta energética en la cabra, Morand-Fehr et al. (1991) exponen que en razas lecheras un aporte energético elevado es esencial para obtener un contenido adecuado de proteína bruta y proteína coagulable en la leche. En el presente trabajo, podríamos considerar un aporte energético adecuado, de modo que se produce una cantidad de proteína en leche también adecuada, como se expone en el apartado

4.8. Además, dado que el aporte energético fue similar para las distintas dietas experimentales, la composición de la leche resultaba también similar. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Sanz Sampelayo et al. (2004), que aportando cantidades distintas de grasa protegida no observaron cambios en la producción de leche, proteína y grasa de la misma. Dichos autores, atribuyeron este efecto a la similitud de ingestas energéticas para las distintas dietas, dado que este es el factor principal que determina el contenido de proteína y grasa de la leche (Giger et al., 1987; Sanz Sampelayo et al., 1998). Además, los resultados comentados anteriormente también pueden reflejarse en las relaciones establecidas entre EL/ED, EL/EM, EL/EP, EL/EB.

Como se expone en el apartado anterior, una posible vía de mejora de la calidad de estas dietas, sería una reducción de la degradabilidad de la proteína, que resultaría en una mayor eficiencia de utilización del nitrógeno para la producción de leche, contribuyendo, al mismo tiempo, a una mayor eficiencia de utilización de la energía.

#### 4.8. PRODUCCIÓN Y COMPOSICIÓN DE LA LECHE

##### 4.8.1. Producción de leche y de sus componentes principales.

En la Tabla 20 se presenta la producción (g/día) y la composición (g/kg) de la leche obtenida en los ensayos, así como los rendimientos (g/día) de sus principales componentes. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los parámetros anteriormente citados. Los valores obtenidos resultaron muy similares entre dietas, representando cantidades indicativas de una buena producción y composición (Analla et al., 1996). En este sentido, cabría destacar que algunos autores (Badamana y Sutton, 1992) indican que cuando la cabra se encuentra bajo las condiciones de manejo intensivo que conlleva un ensayo de balance, la producción y composición de la leche es peor que cuando se encuentra bajo condiciones normales de explotación, aspecto que no se refleja en este estudio.

Tabla 20. Producción y composición de la leche procedente de cabras que consumían dietas que incluían cuatro leguminosas distintas.

	Dietas <sup>1</sup>				DER	Significación Estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza		
Producción (g/día) g/ kg de leche	1647,9	1666,1	1632,9	1628,6	294,8	NS
MS	135,2	136,9	137,2	135,5	5,55	NS
Proteína	32,4	32,0	31,2	31,6	1,89	NS
Caseína	27,3	26,7	26,0	26,4	2,17	NS
Grasa	52,5	52,0	54,7	52,5	4,86	NS
Minerales	8,0	8,0	7,9	7,8	0,34	NS
Lactosa	42,3	45,0	43,5	43,6	2,4	NS
Energía	3,4	3,4	3,4	3,4	0,17	NS
g/ día						
MS	221,6	226,8	222,4	218,9	36,98	NS
Proteína	52,9	53,0	50,6	51,0	7,91	NS
Caseína	44,4	44,1	42,3	42,4	5,84	NS
Grasa	86,0	86,2	87,6	84,7	17,64	NS
Minerales	13,2	13,2	12,9	12,7	2,25	NS
Lactosa	69,5	74,4	71,2	70,5	10,94	NS
Energía	5,53	5,66	5,57	5,45	0,98	NS

<sup>1</sup>Dietas: habas, yeros, altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína es aportada por cada una de estas leguminosas. DER: desviación estándar residual. NS: no significativo.

Además de los valores presentados, se pueden calcular, como indicativos de la producción de leche, las relaciones entre la ingesta de materia seca y la producción correspondiente (kg MS ingerida/kg leche producida). Estos valores son de 0,917, 0,905, 0,899 y 0,928, para las dietas que incluían habas, yeros, altramuz y veza, respectivamente. Además de mostrarse muy similares, indicaban una buena utilización del alimento para la producción de leche. Respecto a la utilización de la proteína ingerida para la producción de proteína láctea, como se discutió en el capítulo correspondiente, las relaciones entre el nitrógeno ingerido y el nitrógeno derivado a leche, resultaban prácticamente idénticas para las distintas dietas experimentales.

Puesto que actualmente el destino preferente de la leche de cabra es la fabricación de queso, se pueden destacar tres datos referentes a la composición. En primer lugar, la cantidad de proteína de la leche, que presenta en todos los casos valores superiores a 30 g/kg de leche; en segundo lugar, la fracción que representa la caseína del total de la proteína, fracción coagulable y principal factor determinante del rendimiento quesero (Morand-Ferh et al., 1991; Remeuf et al., 1991), que era superior al 83% para todos los casos; en tercer lugar, la cantidad de grasa, con valores de entre 52,5 y 54,7 g/kg de leche, que además de determinar, a un nivel inferior al de la proteína, el rendimiento quesero (Morand-Ferh et al., 1991; Remeuf et al., 1991) determina la cremosidad y el sabor del producto (Morand-Ferh et al., 2000).

Morand Fehr et al. (1991), en una revisión al respecto, exponen que generalmente, con dietas isoenergéticas e isonitrogenadas, tanto el contenido de proteína y caseína como el de grasa de la leche de cabra, no parecen ser especialmente sensibles a

cambios en la fuente proteica de la dieta. Salhu et al. (1993) no observaron ningún efecto sobre la producción de leche de cabras alimentadas con dietas que presentaban distinta cantidad y degradabilidad de la proteína, asumiendo que esta falta de respuesta podría deberse a una ingesta elevada. Sin embargo, Sanz Sampelayo et al. (1999) evaluaron la producción y composición de la leche, en función de cuatro fuentes proteicas distintas, teniendo también en cuenta parámetros que describen la naturaleza de la proteína, como son las características de su degradación en el rumen y la composición aminoacídica de la fracción no degradable. Estos autores, concluyeron que en dietas isoenergéticas e isonitrogenadas, la naturaleza de la fuente proteica puede influir en la cantidad y composición de la proteína de la leche producida, encontrando una estrecha relación entre la fracción de la proteína rápidamente degradable en el rumen y la producción de proteína en la leche. Fernández et al. (2004), realizaron un estudio similar al del presente trabajo, empleando raciones completas isoenergéticas e isoproteicas en cabras Murciano-Granadinas para la evaluación de harina de girasol frente a harina de soja, no encontrando diferencias significativas en cuanto a ingesta, producción y composición química de la leche producida. Estos autores concluyeron que el uso de una u otra fuente proteica no afectó al desarrollo de los animales durante la lactación, debido a que las dietas estuvieron bien balanceadas en nutrientes.

Aún cuando los estudios sobre las características de degradación y valor nutritivo de las leguminosas son relativamente abundantes, la bibliografía disponible acerca del efecto de la inclusión de leguminosas grano en dietas de rumiantes en lactación, sobre todo en cabras, es muy escasa. Existen numerosos estudios acerca del efecto de la inclusión de altramuz sobre la producción y composición de la leche de vaca (Guillaume et al, 1987; May et al., 1991; Robinson y McNiven, 1993; Singh et al., 1995, Bayourthe et al., 1998, Froidmont y Bartiaux-Thill, 2004). En estos estudios se emplea siempre harina de soja como fuente de proteína control, obteniéndose resultados muy diversos, dado que consideran distintos niveles de leguminosa en el concentrado, distinta relación forraje:concentrado, emplean semilla completa o molida, cruda o tratada. No obstante, los resultados sugieren que la sustitución de harina de soja por altramuz crudo o molido, resultaría en una producción de leche igual o ligeramente inferior a la promovida con harina de soja.

Guillaume et al. (1987), observaron el efecto de la inclusión de altramuz molido frente a soja en dietas isonitrogenadas en vacas en lactación. Aquellos animales alimentados con altramuz, consumían menos materia seca y producían menos leche, con menor porcentaje de proteína, que las vacas suplementadas con harina de soja. Sin embargo, estudios posteriores de May et al. (1993) demostraron que vacas alimentadas con altramuz, con una tasa de inclusión en la dieta del 75% de la proteína, en comparación con aquellas cuya dieta incluía harina de soja, presentaban ingestas de materia seca similares y cantidades iguales de leche producida y de proteína de la leche. Robinson y McNiven (1993) estudiaron la suplementación con altramuz molido groseramente, crudo y tratado, frente a la suplementación con harina de soja.



Observaron que, pese a una menor ingesta de materia seca en las vacas alimentadas con ambos tipos de altramuz, la producción de leche y sus componentes fueron similares para las tres fuentes proteicas, aunque la cantidad de proteína en la leche, en el caso de la suplementación con altramuz, fue menor. Singh et al. (1995), también observaron que la ingesta de materia seca en vacas alimentadas con altramuz crudo o tratado, resultaba menor que en las alimentadas con harina de soja, no obteniéndose, en este caso, diferencias en la producción de leche. Sin embargo, aquellos animales alimentados con altramuz tratado incrementaron su producción de leche, así como la cantidad de grasa, proteína y lactosa de la misma. Con respecto al empleo del altramuz en ovejas en lactación, Masucci et al. (2006) estudiaron el efecto de la sustitución, en dietas isonitrogenadas, de harina de soja por altramuz. Esta sustitución no dio lugar a diferencias significativas en cuanto a ingesta de materia seca, producción y características de la leche. No obstante, aunque no existieron diferencias, el porcentaje de grasa y proteína de la leche procedente de animales alimentados con altramuz fue ligeramente menor, indicando que estos resultados podrían deberse a la mayor degradabilidad del altramuz frente a la harina de soja.

En relación a la alimentación de las cabras, Varela et al. (1959), ensayaron comparativamente dos leguminosas, habas y veza, en cabras de raza granadina, observando que el empleo de estas leguminosas, no provocaba modificaciones de la cantidad de leche producida, ni del porcentaje de grasa, concluyendo que ambos alimentos eran adecuados para la producción. Masson (1981a,b) estudió la inclusión de habas, guisantes y altramuz en cabras de raza Alpina, como sustitutos de la soja. Estos autores, obtuvieron una ingesta de materia seca y una producción de leche similar, concluyendo que la composición de la leche resultó poco afectada por la naturaleza de la fuente proteica incluida en la dieta. Sanz Sampelayo et al. (1999) estudiaron el empleo de las habas como fuente de proteína en dietas para cabras en lactación, obteniendo una leche cuya composición era similar a la obtenida en este estudio con la dieta que incluía habas.

En el presente trabajo, tanto la ingesta como los parámetros de degradación de la proteína en el rumen no difieren en gran medida entre leguminosas ni entre las dietas experimentales. De acuerdo con lo comentado anteriormente, estos aspectos indicarían que el empleo de distintas leguminosas grano como fuentes proteicas, de calidad y naturaleza similar, en dietas isoenergéticas e isonitrogenadas, no daría lugar a diferencias en la cantidad y calidad de la leche producida.

Por otro lado, parece demostrado que en el rumiante en lactación, el empleo del altramuz para sustituir a la harina de soja sería adecuado, puesto que se obtiene una producción y composición de la leche parecida a la que tendría lugar con el consumo de dietas basadas en harina de soja. Partiendo de este hecho y, dado que en este estudio se obtiene una producción y composición de la leche semejante con las distintas dietas experimentales, se puede suponer que el empleo de cualquiera de las leguminosas grano sería adecuado como alternativa a la harina de soja. No obstante, hay autores que

sugieren que habría que asegurar el adecuado balance entre la proteína degradable y no degradable en las raciones completas (Masucci et al., 2005).

#### 4.8.2. Perfil en ácidos grasos de la leche.

En la Tabla 21 se presenta la composición en ácidos grasos de la leche en función de la dieta consumida. En general, el perfil en ácidos grasos de la leche producida con el consumo de las distintas dietas experimentales es parecido. La leche procedente de los animales alimentados con la dieta que incluía altramuz, presentó un valor para el C16:0 (24,61%) y el C18:0 (8,76%) menor y mayor, respectivamente, y estadísticamente significativos ( $P<0,05$ ) que los valores obtenidos para las leches producidas por el consumo de las otras dietas experimentales. La leche procedente de los animales que consumieron la dieta altramuz presentó mayor cantidad de C18:2 (1,73%) y diferente estadísticamente ( $P<0,05$ ) de la que presentaba la leche producida con el consumo de la dieta con veza (1,16%).

Tabla 21. Composición en ácidos grasos (% de MS) de la leche producida por los animales alimentados con las distintas dietas experimentales.

	Dietas <sup>1</sup>				DER	Significación estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza		
Butírico, C4	2,12	2,33	2,33	1,93	0,29	NS
Caproico, C6	4,12	4,20	4,43	3,97	0,31	NS
Caprílico, C8	5,57	5,51	5,83	5,17	0,51	NS
Capricho, C10	19,40	19,24	19,03	18,67	1,31	NS
Laurico, C12	7,08	7,01	6,43	6,99	0,53	NS
Miristoleico, C14	11,42	11,36	10,59	11,32	0,60	NS
Mirístico, C14:1	0,31	0,19	0,31	0,42	0,15	NS
Palmítico, C16	27,28 <sup>a</sup>	27,53 <sup>a</sup>	24,61 <sup>b</sup>	29,48 <sup>a</sup>	1,35	*
Esteárico, C18	6,67 <sup>a</sup>	6,55 <sup>a</sup>	8,76 <sup>b</sup>	6,38 <sup>a</sup>	0,91	*
Oleico, C18:1	13,72	13,79	14,93	13,67	1,88	NS
Linoleico, C18:2	1,42 <sup>a,b</sup>	1,46 <sup>a,b</sup>	1,73 <sup>a</sup>	1,16 <sup>b</sup>	0,17	*
Araquídico, C20	0,17	0,12	0,21	0,20	0,06	NS
Linolénico, C18:3	0,35	0,25	0,29	0,30	0,07	NS
CLA 9c-11t	0,23	0,30	0,32	0,20	0,10	NS
Araquidónico, C20:4	0,14	0,17	0,21	0,13	0,05	NS
AGCM (C6:0-C14:0)	47,58	47,32	46,30	46,13	2,40	NS
AGCM (C6:0-C10:0)	29,08	28,96	29,29	27,82	2,07	NS
AGCL (C16:0-C20:4)	49,99	50,16	51,07	51,52	2,45	NS

<sup>1</sup>Dietas: habas, yeros, altramuz y vez, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. AGCM: ácidos grasos de cadena media; AGCL: ácidos grasos de cadena larga. DER: desviación estándar residual. Dentro de una misma fila, los valores medios afectados por letras diferentes resultan estadísticamente distintos ( $P<0,05$ ). NS: no significativo. \*:  $P<0,05$ .

La composición en ácidos grasos de las semillas de las leguminosas consideradas en este estudio resultó similar, como se comenta en el apartado 4.1 de esta memoria, por lo que la composición de la leche producida por el consumo de las dietas

elaboradas en base a estas leguminosas debería ser, en principio, también parecida. En general, las semillas de las leguminosas son ricas en ácidos grasos de 18 átomos de carbono, sobre todo en linoleico (C18:2) y oleico (C18:1). Aunque las semillas de altramuzy veza presentaban un porcentaje de C18:1 más elevado (30,91 y 33,19%, respectivamente) con respecto a las habas y los yeros (18,89 y 8,05%, respectivamente), no se observaron diferencias significativas con respecto a estos ácidos grasos para la leche producida por el consumo de las dietas que incluían estas leguminosas. Sin embargo la leche procedente del consumo de la dieta con altramuzy, presentaba el valor más alto de C18:1 (14,93%). Igualmente, las semillas de habas y yeros presentaban unos niveles de C18:2 (66,84 y 71,98%, respectivamente) superiores a los de altramuzy veza (49,68 y 48,5%, respectivamente), obteniéndose el valor más elevado para la leche producida con la dieta que incluía altramuzy (1,73%) y diferente estadísticamente ( $P < 0,05$ ) del de la leche producida por el consumo de la dieta con veza (1,16%).

Según distintos autores, el contenido en ácido ruménico de la leche de cabra se sitúa en torno a 0,4-0,9% (Alonso et al., 1999; Gulati et al., 2000; Chilliard et al., 2002), dependiendo de la concentración y composición de la grasa de la dieta. Chilliard et al. (2003) exponen que el contenido en CLA en la leche de cabra incrementa marcadamente después de la suplementación con aceites vegetales o con la alimentación de pasto fresco, sin embargo no observan cambios importantes cuando las cabras se alimentan con semillas oleaginosas completas. Estos autores, emplearon dietas con un 30% de pasto fresco y un 70% de concentrado, suplementado o no con determinados aceites o semillas. Chilliard et al. (2003) observaron que tanto la suplementación con soja como con altramuzy, ricas en poliinsaturados, no provocó el aumento en la leche de estos ácidos grasos observándose además un bajo nivel de los ácidos ruménico y trans-vacénico (0,30 y 0,70%, respectivamente, para la leche producida por el consumo de la dieta que incluía altramuzy y 0,40 y 0,90% respectivamente, para la leche producida por el consumo de la dieta con semilla de soja). Estos autores, atribuyeron este hecho a la completa hidrogenación de las semillas proponiendo su tratamiento, mediante la molienda o aplicación de calor, para el aumento del CLA en la leche de cabra. Los resultados del presente estudio están de acuerdo con lo obtenido por Chilliard et al. (2003) para la cantidad de CLA en leche de cabras alimentadas con semilla de altramuzy, aunque en este caso se empleó un relación distinta entre forraje y concentrado. Como se comentó anteriormente, no se observa una transferencia de los ácidos grasos mayoritarios en las leguminosas, linoleico y oleico, hacia la leche, probablemente porque la hidrogenación en el rumen limita su incorporación a la leche.

El mayor contenido en C18:0 ( $P < 0,05$ ) de la leche procedente de los animales alimentados con la dieta que incluía altramuzy podría deberse a una mayor hidrogenación en el rumen de los poliinsaturados de 18 átomos de carbono. Sin embargo, la leche procedente del consumo de la dieta con altramuzy, presentara mayor

cantidad de C18:1 y C18:2, que la leche producida por el consumo de las otras dietas experimentales, por lo que se produjo una transferencia de estos ácidos grasos a la leche de mayor medida que para las otras dietas experimentales. Robinson y McNiven (1993) emplearon altramuz, molido de manera grosera o tratado con calor, como sustituto de la harina de soja en dietas de vacas en lactación. Estos autores obtuvieron que la leche procedente de las dietas con altramuz, presentó mayor cantidad de ácidos grasos de cadena larga y menor cantidad de los de cadena corta, debido a la inhibición de la síntesis de novo en la glándula mamaria, que la leche de los animales que consumieron harina de soja. Estos autores concluyeron que tanto la molienda grosera de la semilla como el tratamiento con calor, reducían el grado de hidrogenación en el rumen de la grasa posibilitando la transferencia de los poliinsaturados de cadena larga característicos del altramuz, a la leche. Posteriormente Singh et al. (1995) obtuvieron resultados similares a los de los autores anteriores, con el empleo de una dieta que incluía semilla de altramuz tratada con calor. Froidmont y Bartiaux-Thill (2005) también observan una mayor transferencia de ácidos grasos de cadena larga con el empleo de dieta con altramuz molido, poniéndose de nuevo de manifiesto que la molienda reduce el grado de hidrogenación en el rumen. Cabe también destacar que la leche producida por el consumo de la dieta que incluía altramuz, presenta un porcentaje de C16:0, considerado hipercolesterolémico, más bajo y diferente estadísticamente ( $P < 0,05$ ) de los de la leche producida con el consumo de las otras dietas experimentales, al igual que lo observado por otros autores (Robinson y McNiven, 1993; Singh et al., 1995; Froidmont y Bartiaux-Thill, 2005) en leche producida por vacas alimentadas con altramuz respecto a la leche de aquellas alimentadas con dietas que incluían soja. Según lo comentado anteriormente, y como se expone en otros apartados de esta memoria, el tratamiento de las semillas de leguminosas con calor podría aportar beneficios, como el aumento de la transferencia de los ácidos grasos poliinsaturados contenidos en ellas.

Con respecto a la cantidad de ácidos grasos de cadena media, Chilliard et al. (2003) obtuvieron cantidades muy bajas en la leche producida por animales alimentados con dietas que incluían altramuz o soja, al contrario de lo observado en este estudio. Por otro lado, Masucci et al. (2006) obtuvieron que con el empleo de dietas completas para ovejas, la leche obtenida por el consumo de una dieta que incluía altramuz presentaba un contenido elevado de ácidos grasos de cadena media, con respecto a la leche producida por los animales que consumieron la dieta con harina de soja. El mayor contenido en MCT de la leche producida por el consumo de la dieta que incluía altramuz podría deberse a una competencia más eficiente de los ácidos grasos de cadena media frente a los de cadena larga por la posición n3 del triglicérido durante su síntesis en la leche. Como se expone en la revisión bibliográfica, uno de los aspectos de la composición más interesante ligado a la leche de cabra es el contenido en triglicéridos de cadena media (MCT), formados por ácidos grasos de cadena carbonada comprendida entre 6 y 14 átomos de carbono. Los MCT presentan un interés especial desde el punto de vista terapéutico dado su particular metabolismo y, en consecuencia,

su utilidad en determinadas enfermedades metabólicas (Haenlein 1992, 1996, 2001, 2004; Boza y Sanz Sampelayo, 1997; Sanz Sampelayo y Boza, 2005) Los MCT siguen una vía metabólica distinta de los triglicéridos constituidos por ácidos grasos de cadena larga. Los ácidos grasos libres, originados en la hidrólisis de los MCT, son capaces de ser reabsorbidos sin reesterificación en las células intestinales entrando directamente en la vena porta, siendo transportados al hígado y tejidos periféricos donde son oxidados para producir energía. Su bajo peso molecular y su hidrosolubilidad facilitan la acción de los enzimas digestivos, haciendo que la hidrólisis sea más rápida y completa que la de los triglicéridos de cadena larga. Además, a diferencia de los triglicéridos de cadena larga, la digestión de los MCT comienza a producirse en el estómago, puesto que la lipasa gástrica, prácticamente sin acción sobre los triglicéridos de cadena larga, inicia la hidrólisis de los MCT que se completará por la lipasa pancreática, a un ritmo cinco veces superior a los de los triglicéridos de cadena larga (Haenlein 1992, 1996; García Unciti, 1996). Los ácidos grasos cáprico y caprílico, así como diferentes MCT han llegado a constituir tratamiento para pacientes con diferentes tipos de malabsorción, resección intestinal, utilizándose también en la alimentación de pacientes desnutridos, niños prematuros, epilepsia infantil, entre otras patologías, todo ello en función de la facilidad que para generar energía de estos ácidos grasos (Babayán, 1981; Haenlein, 1992; García Unciti, 1996). En el presente estudio, el contenido en ácidos grasos de cadena media (C6-C14) de la grasa de la leche promovida por el consumo de las cuatro dietas experimentales, resultó superior al 45%, aspecto relevante de acuerdo con lo indicado anteriormente. Incluso considerando solo los ácidos grasos de cadena comprendida entre C6-C10, a los que actualmente se les atribuyen los efectos positivos derivados del consumo de los MCT, la grasa de la leche producida alcanzaba valores superiores al 26%. En general, la grasa de la leche de cabra presenta unos niveles superiores de los ácidos caproico, caprílico y caprílico (15-18%) a los de la leche de vaca (5-9%) (Boza y Sanz Sampelayo, 1997). Según Chilliard, las diferencias entre la composición de ácidos grasos de la leche de cabra y la de vaca se deben a que la regulación del comportamiento de las células mamarias difiere entre la especie caprina y bovina, sobre todo en lo que se refiere a los procesos de elongación de los ácidos grasos, que son sintetizados de novo en el complejo ácido graso sintetasa.

#### 4.9. CALIDAD TECNOLÓGICA DE LA LECHE

Como se expuso en el apartado correspondiente de esta memoria, para la valoración de la calidad tecnológica de la leche se realizaron estudios de coagulometría y se llevó a cabo la elaboración de queso, evaluándose distintos parámetros y aptitudes. En la Tabla 22, se muestran los valores de los rendimientos queseros, calculados en el momento de la elaboración (R1) o 21 días después de ésta (R2), y los parámetros obtenidos mediante el coagulómetro, siendo R el tiempo de coagulación en minutos y

AR y A2R, la firmeza del coagulado medida en voltios, a los tiempos R y 2R, respectivamente.

Tabla 22. Rendimientos queseros (R1 y R2) y parámetros obtenidos por coagulometría (R, AR, A2R), según el consumo de las distintas dietas.

	Dietas <sup>1</sup>				DER	Significación Estadística
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza		
R1	20,49	20,09	21,78	21,40	0,53	NS
R2	8,90	9,40	9,00	8,80	0,66	NS
R (minutos)	9,63	9,50	10,28	9,08	0,33	NS
AR (voltios)	4,11	3,72	3,91	3,84	0,35	NS
A2R (voltios)	4,95	4,47	4,71	4,89	0,67	NS

<sup>1</sup>Dietas: habas, yeros, altramuz y veza, en las que el 30% de la proteína está aportada por cada una de estas leguminosas. DER: desviación estándar residual. NS: no significativo.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre los parámetros anteriormente descritos, en función de la dieta consumida. Los valores para los rendimientos queseros, R1 y R2, fueron muy parecidos, 20,09-21,78 y 8,80-9,40, respectivamente, siendo los valores de R, AR y A2R, también similares entre tratamientos.

La calidad de la dieta que consume el animal influye en la calidad de los quesos, a través de la composición de la leche producida. El rendimiento quesero está estrechamente relacionado con la composición de la leche, especialmente con el contenido en caseína y grasa (Remeuf, 1991). No obstante, otros parámetros pueden influir en el comportamiento de la leche en el proceso de coagulación, como la proporción de caseínas individuales, el tamaño de las micelas y su mineralización, etc. (Remeuf, 1991). Puesto que la composición de la leche producida por los animales alimentados con las distintas dietas experimentales fue similar, cabría esperar un rendimiento quesero parecido. Esta observación está de acuerdo con los resultados de Masucci et al. (2006), que obtuvieron características de coagulación similares para la leche producida por ovejas alimentadas con semilla de altramuz o soja como fuentes de proteína, atribuyendo este efecto a pequeñas diferencias en el contenido proteico de la leche. Sanz Sampelayo et al. (1998) determinaron los rendimientos queseros, así como los parámetros de coagulometría, para la leche y quesos de cabra obtenidos en función del consumo de distintas dietas experimentales. Estos autores obtuvieron diferentes rendimientos, que asociaron a distinta cantidad de proteína coagulable en la leche debido a la naturaleza de la proteína de la dieta.

Recientemente, el aumento de la demanda de queso de cabra ha dado lugar a un gran interés en la predicción de la producción de queso a partir de parámetros de composición de la leche. Se han desarrollado y modificado numerosas ecuaciones para la predicción del rendimiento quesero a partir de la composición de la leche de vaca (Emmons et al., 1990), que no son adecuadas para la predicción del rendimiento del queso de cabra, dada las diferencias en la composición y características de las leches de estas dos especies. Guo et al. (2004) emplearon, como variables, distintos parámetros

de la composición de la leche de cabra y el rendimiento quesero del queso fresco de cabra, para el desarrollo de fórmulas de predicción resultando que el contenido en sólidos totales y proteína fueron los factores que mejor predijeron el rendimiento, seguidos de grasa y caseína. Zeng et al. (2006) realizaron un estudio similar al de los autores anteriores, estableciendo ecuaciones de predicción para el rendimiento del queso de cabra fresco, semicurado y curado. Concluyeron que el mejor factor para la predicción del rendimiento quesero fue la cantidad de sólidos totales, seguido de la grasa y contenido en proteína, mientras que la caseína no fue un buen factor de predicción para el rendimiento de los quesos curados y semicurados. Zeng et al. (2006) observaron que, en general, existía una correlación baja entre el contenido en caseína de la leche y el rendimiento del queso obtenido, que atribuyeron a las diferencias en el contenido en  $\alpha_{s1}$  caseína de la leche.

Si utilizamos las fórmulas de Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006) (Tabla 23) para la predicción del rendimiento del queso fresco, obtenemos los resultados que se muestran en la Tabla 24.

Tabla 23. Ecuaciones de predicción del rendimiento quesero, según Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006).

Ecuaciones de predicción del rendimiento quesero	
Guo et al. (2004)	Zeng et al. (2006)
$Y = 2,64ST - 15,48$ ( $r^2 = 0,81$ )	$y = 2,87ST - 11,79$ ( $r^2 = 0,79$ )
$Y = 8,61PT - 12,76$ ( $r^2 = 0,79$ )	$y = 7,11PT + 0,39$ ( $r^2 = 0,73$ )
$y = 11,87CN - 13,30$ ( $r^2 = 0,75$ )	$y = 6,54CN + 3,50$ ( $r^2 = 0,63$ )
$y = 3,85G - 3,31$ ( $r^2 = 0,75$ )	$y = 5,94G + 0,87$ ( $r^2 = 0,81$ )

ST: sólidos totales; PT: proteína total; CN: caseína; G: grasa.

Tabla 24. Rendimientos queseros de las leches producidas bajo el consumo de las dietas experimentales, calculados mediante las ecuaciones propuestas por Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006).

	Dietas			
	Habas	Yeros	Altramuz	Veza
R (ST) (Guo et al., 2004)	20,21	20,69	20,77	20,29
R (ST) (Zeng et al., 2006)	27,01	27,53	27,62	27,10
R (PT) (Guo et al., 2004)	15,14	14,79	14,10	14,45
R (PT) (Zeng et al., 2006)	23,43	23,14	22,57	22,86
R (CN) (Guo et al., 2004)	19,11	18,39	17,56	18,04
R (CN) (Zeng et al., 2006)	21,35	20,96	20,50	20,77
R (G) (Guo et al., 2004)	16,90	16,71	17,75	16,90
R (G) (Zeng et al., 2006)	32,06	31,76	33,36	32,06

R (ST), R (PT), R (CN), R (G): rendimientos queseros empleando como variable la cantidad de sólidos totales, proteína total, caseína y grasa, respectivamente.

Se observa que los valores de los rendimientos varían en función de la variable considerada en la ecuación de predicción. Además, los valores estimados por las ecuaciones de Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006) empleando la misma variable, son diferentes. No obstante, los rendimientos queseros son similares para las distintas

dietas experimentales, debido a que la composición de la leche resultó muy similar, como se comenta en un apartado anterior. No se han obtenido rendimientos para quesos semicurado o curado, puesto que las ecuaciones obtenidas por Zeng et al. (2006) en este sentido, presentan una correlación muy baja. Se puede observar que la predicción del rendimiento quesero, a partir de algunas de las ecuaciones propuestas por Guo et al. (2004) y Zeng et al. (2006), es parecida a los rendimientos determinados en este estudio. Concretamente, los resultados de este trabajo se podrían asemejar a los obtenidos mediante las ecuaciones de los autores anteriores, en las que emplean como variables el porcentaje de sólidos totales y el de caseína.

Como se indicó en el apartado 4.8, la composición en ácidos grasos de la grasa de la leche obtenida por el consumo de las cuatro dietas experimentales, resultaba particularmente elevada en ácidos grasos de cadena media, que daría lugar a quesos con características saludables para el consumo humano. Esta propiedad de la leche producida por el consumo de las cuatro dietas experimentales empleadas en este estudio, podría suponer un impulso de la consideración de los productos derivados de la cabra como alimentos de carácter funcional. Por tanto, la leche y quesos obtenidos por el consumo de las dietas que incluían habas, yeros, altramuz y veza, dado su alto contenido en triglicéridos de cadena media, podría tener un potencial de mercado considerable. Este aspecto también queda reflejado por Masucci et al. (2006), que obtienen una leche de oveja con una proporción elevada de triglicéridos de cadena media debido al consumo de una dieta que incluía altramuz.

#### 4.10. PATRÓN DE RELACIÓN ENTRE LA NATURALEZA DE LAS FUENTES PROTEICAS Y LA PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA LÁCTEA: ANÁLISIS MULTIVARIANTE FACTORIAL.

Diferentes autores (Chatfield y Collins, 1980; Sanz Sampelayo et al., 1999) han indicado que los resultados obtenidos mediante el análisis multivariante, adquieren un significado no solo estadístico, sino también biológico. Por medio del análisis multivariante se reduce un conjunto de variables relacionadas entre sí, a otras nuevas denominadas factores que resultan más explicativas y que son independientes entre sí. Dado el método utilizado para la derivación de los factores, el de componentes principales, es posible deducir la fracción de la varianza total que cada uno de los factores puede explicar (Chatfield y Collins, 1980).

En este estudio se realizó un análisis multivariante factorial considerando las variables que definen la naturaleza de la proteína de las distintas leguminosas grano y aquellas que determinan la proteína de la leche producida por el consumo de las dietas experimentales. Por tanto para la realización de este análisis se tuvieron en cuenta las características de la degradación de la proteína en el rumen corregidas para la pérdida de partículas (fracción de la proteína rápidamente degradable y lentamente degradable, fracción de la proteína no degradada en el rumen), la composición en aminoácidos



esenciales de la fracción no degradada, así como el contenido en caseína y proteínas del suero de la leche. Estos valores se expresaron por unidad de peso metabólico, de acuerdo con las ingestas y producciones individuales de los animales. Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en la Tablas 25. Los dos factores derivados, explican en conjunto el 87,68% de la varianza total (64,77 y 22,91%, respectivamente para los factores 1 y 2) (Tabla 25).

Dado que en este tipo de análisis los factores representan a unas variables no correlacionadas entre sí (Chatfield y Collins, 1980), es posible identificar grupos de variables que se comportan de manera diferente e independientemente. De acuerdo con lo expuesto, los resultados obtenidos ponen claramente de manifiesto el distinto comportamiento con respecto a la fracción ingerida de la proteína no degradada de cada fuente proteica y el contenido en aminoácidos esenciales de la misma, excepto de treonina; y también se observa un patrón diferente, según el tratamiento, en cuanto a la ingesta de proteína rápidamente degradable de cada fuente proteica, junto a las cantidades de proteína láctea producida, tanto de caseína como de proteína sérica.

En la Tabla 25, también se muestra la matriz de componentes rotados procedente del análisis multivariante. Teniendo en cuenta las variables que definían con mayor peso a cada uno de los factores, el factor 1 queda definido, de manera positiva, por la ingesta de proteína no degradada de las leguminosas, así como por los aminoácidos que la componen, excepto por la treonina, que presenta un valor bajo. Con respecto al valor del factor 1 para los parámetros de la composición de la leche producida, la caseína es la que presentaría es más elevado, quedando relacionada, ligeramente, con la ingesta de proteína no degradada de las leguminosas grano. El factor 2 quedaría positivamente definido por la ingesta de proteína rápidamente degradable y por la composición en caseínas y proteínas del suero de la leche producida por el consumo de las distintas dietas experimentales. De acuerdo con lo indicado, primeramente habría que considerar que la proteína rápidamente degradable sería la fracción de la proteína ingerida que determinaría, de manera especial, la producción de proteína láctea (Factor 2). También puede deducirse que la proteína no degradada en el rumen podría establecer, aunque de una manera más débil, la producción de proteína láctea, sobre todo en cuanto a la caseína (Factor 1). Respecto del particular comportamiento de la treonina, lo único que se podría indicar es que las habas presentaban una cantidad de proteína no degradada en el rumen mayor que la de las demás leguminosas, considerando las características de degradación de la proteína corregidas para la pérdida de partículas, presentando un porcentaje en treonina más bajo que el de las otras fuentes proteicas.

Tabla 25. Variables que definen la naturaleza de la proteína de las leguminosas, así como el aporte de aminoácidos esenciales de su fracción no degradada en el rumen, y valores de producción de proteína láctea (caseínas y proteínas del suero). Resultados del análisis multivariante factorial.

Matriz de componentes rotados		
Variable	1	2
IPRD	0,1	0,882
IPLD	-0,65	0,671
IPND	0,987	0,114
Lis	0,97	0,149
His	0,975	0,083
Tre	0,326	0,519
Arg	0,984	0,079
Val	0,972	0,183
Ile	0,97	0,184
Leu	0,98	0,175
Fen	0,969	0,208
Met	0,921	0,294
Caseína	0,211	0,813
Proteína suero	0,129	0,879
	Varianza explicada (%)	Varianza explicada acumulada (%)
Factor 1	64,77	64,77
Factor 2	22,91	87,68

En la Figura 12, se representan, respecto de los factores 1 y 2, la situación de las distintas variables y áreas de dispersión de las unidades experimentales, según la leguminosa consumida en la dieta. Se observa que el Factor 1 separa claramente a los grupos de animales, en función de la fuente proteica consumida, estableciendo el siguiente orden: habas, yeros, veza y altramuza, de acuerdo con su degradabilidad. Respecto del Factor 2, y teniendo en cuenta el significado del mismo, no resulta posible distinguir las unidades experimentales pertenecientes a cada tratamiento.

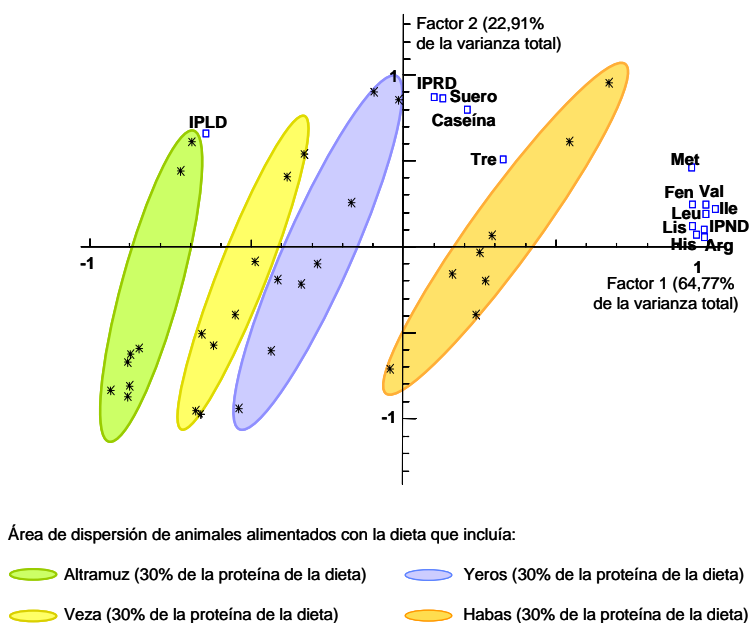


Figura 12. Situación de las variables que definen la naturaleza de las leguminosas (IPLD: ingesta de proteína lentamente degradable; IPRD: ingesta de proteína rápidamente degradable; IPND: ingesta de proteína no degradada en el rumen), así como el aporte de aminoácidos esenciales de la IPND, y la producción de proteína láctea (caseína y proteína sérica), en relación a los dos factores derivados. Área de dispersión de las unidades experimentales, según la leguminosa consumida, en relación a los dos factores derivados.

Los resultados obtenidos de este análisis, están de acuerdo con lo expuesto por Sanz Sampelayo et al. (1999). Estos autores concluyeron que la fracción de la proteína rápidamente degradada en el rumen esta estrechamente relacionada con la proteína de la leche. Chandler (1995) indicó que las fuentes de proteína rápidamente degradable estarían relacionadas con la proteína microbiana, que podría ser suplementada con fuentes de proteína no degradable en el rumen, cuya influencia en el rumiante en lactación, estaría en función de su cantidad y composición aminoacídica. Estas observaciones coinciden con las obtenidas en este estudio.



## **5. RESUMEN Y CONCLUSIONES**

---



## 5. RESUMEN Y CONCLUSIONES

Actualmente existe una demanda elevada de proteína vegetal para la alimentación animal como consecuencia de la aparición de la Encefalopatía Espongiforme Bovina, que llevó a la prohibición del empleo de harinas animales para la alimentación de los rumiantes, y de la necesidad de reducir la dependencia exterior del sector ganadero. Por ello, se consideró de interés la valoración del empleo de leguminosas grano como fuentes de proteína en dietas para ganado caprino en lactación. Las zonas mediterráneas de la Unión Europea, y concretamente Andalucía, son adecuadas para el cultivo de leguminosas grano que, además, podría contribuir a la mejora de los suelos de secano, al aumentar la población de bacterias fijadoras de nitrógeno. En estos ambientes áridos y semiáridos, la cabra sería la especie animal de elección, dada su capacidad de adaptación a ese tipo de ecosistemas y al valor de sus producciones. El interés de la leche de cabra se centra, fundamentalmente, en su empleo para la producción de queso, vislumbrándose la posibilidad de su utilización como base de otros derivados lácteos, dada su calidad, no solo nutritiva sino también saludable. Por ello se estudió la producción y composición de la leche obtenida por el consumo de dietas que incluían leguminosas grano en su composición.

De acuerdo con lo planteado, se determinó la composición química de las leguminosas objeto de estudio (habas, yeros, altramuza y veza) y de las dietas diseñadas en base a ellas, así como las características de degradación en el rumen y la digestibilidad intestinal, mediante dos metodologías distintas. Además, para cada leguminosa, se determinó la composición aminoacídica de su proteína y de la fracción no degradada de la misma. Paralelamente, se llevaron a cabo ensayos de valoración nutritiva en cabras en lactación, analizándose la utilización digestiva y metabólica de los nutrientes y la producción, composición y calidad tecnológica de la leche producida, en función de la dieta consumida.

Las leguminosas grano presentaron un elevado contenido en proteína. Su contenido en grasa resultó bajo, excepto para el altramuza, siendo mayoritarios los ácidos linoleico y oleico. El contenido en taninos fue elevado, excepto para el altramuza, aunque no pareció afectar a la disponibilidad de la proteína. Las características de degradación ruminal de la materia seca y de la proteína, tanto de las leguminosas como de las dietas experimentales que las incluían, resultaron elevadas, aunque estas últimas mostraron valores diferentes entre sí debido, probablemente, a la interacción entre los ingredientes de la dieta. El grado de pérdida de partículas, que fue considerable, varió entre leguminosas y dietas ejerciendo, por tanto, efectos de distinta magnitud sobre las características de su degradación ruminal. La composición aminoacídica de la proteína de las leguminosas grano estudiadas resultó similar. Por el contrario, la composición en aminoácidos de la fracción no degradada en el rumen varió para las distintas leguminosas. El análisis multivariante de los resultados mostró que habas, yeros y veza, que pertenecen al mismo género (*Vicia*), mostraban cambios similares tras la

incubación en el rumen mientras que el altramuz se comportaba de manera distinta. No obstante, los aminoácidos que más se degradaron, para todas las leguminosas, fueron arginina y glutámico, siendo los más resistentes a la degradación en el rumen los aminoácidos ramificados. La utilización de dos metodologías distintas para la estimación *in situ-in vitro* e *in vitro* de la digestibilidad intestinal proporcionó resultados parecidos para la digestibilidad total de la proteína, pero diferentes con respecto a la proteína no degradada en rumen. No obstante, los valores obtenidos mediante la aplicación de ambas técnicas eran elevados, tanto para las leguminosas como para las dietas experimentales.

Con respecto a la valoración nutritiva de las dietas que incluían las distintas leguminosas, se obtuvieron valores elevados y similares tanto de digestibilidad de los distintos nutrientes como de la energía. Se estudió la utilización metabólica y para la producción de leche, tanto del nitrógeno como de la energía, obteniéndose resultados similares para las diferentes dietas. La utilización del nitrógeno de las dietas empleadas en este estudio correspondió con la utilización que se les atribuiría a las leguminosas que dichas dietas incluían, dadas sus características de degradación, observándose una elevada excreción de nitrógeno en orina. Con respecto a la utilización del nitrógeno, cabe destacar que el nitrógeno metabolizable, similar para las distintas dietas, mostró diferente partición hacia leche o retención corporal. El nitrógeno metabolizable derivado a leche fue mayor en la dietas que incluía habas, mientras que el retenido fue mayor para la dieta que contenía yeros.

En cuanto a la producción de leche, el consumo de las distintas dietas experimentales determinó producciones adecuadas y similares. La composición de la leche producida por los animales que recibían las distintas dietas experimentales resultó también similar, presentando una cantidad de grasa y proteína propias de la especie caprina, que destaca por su elevada cantidad de triglicéridos de cadena media, de especial interés en la nutrición humana. Los quesos elaborados con la leche producida por los animales alimentados con las distintas dietas también presentaron rendimientos similares.

Los resultados obtenidos en la presente memoria de tesis doctoral, nos permiten establecer las siguientes conclusiones:

1. La degradabilidad en el rumen de la proteína de las leguminosas grano y de las dietas experimentales es elevada. La consideración de las características de degradación de las leguminosas o de las dietas experimentales, y la aplicación o no de la pérdida de partículas a las características de degradación, podrían suponer distinto valor biológico.
2. La fracción de la proteína de las distintas leguminosas que no se degrada en el rumen difiere, en cuanto a su potencial cuantitativo y cualitativo, como fuente de aminoácidos absorbibles en el intestino, respecto del de las fuentes proteicas



originales. Independientemente de ello, se considera que la fracción no degradada podría suplementar, a nivel intestinal, a la proteína microbiana.

3. Aunque el método de estimación determina variaciones en la digestibilidad intestinal de la proteína total y de la no degradada en el rumen, los valores son elevados tanto para las leguminosas como para las dietas experimentales. En consecuencia, la proteína no degradada en el rumen contribuiría al pool de aminoácidos para la síntesis de proteína de la leche y para la retención corporal.
4. La digestibilidad in vivo de los nutrientes y de la energía de las dietas experimentales es elevada. La utilización, para la producción de leche, del nitrógeno y de la energía de las distintas dietas es similar. Sin embargo, la partición del nitrógeno metabolizable hacia la excreción en leche o retención corporal, es diferente para las dietas que incluían habas y yeros, lo que podría indicar que la calidad de una proteína para la producción de leche o para la retención corporal, podría ser distinta.
5. La cantidad y calidad de la leche producida se considera adecuada y similar para las distintas dietas experimentales debido a que estas eran isoenergéticas e isonitrogenadas y que incluían leguminosas grano de calidad y naturaleza similares. Destaca el elevado contenido de ácidos grasos de cadena media en la grasa de la leche, reflejándose uno de los aspectos por los que, tanto la leche de cabra como sus productos derivados, podrían ser considerados como alimentos de carácter funcional.
6. Puesto que la composición de la leche producida por el consumo de las distintas dietas era parecida, la calidad tecnológica resulta similar y, a la vez, adecuada.



## **SUMMARY AND CONCLUSIONS**

---



## SUMMARY AND CONCLUSIONS

Demand is currently high for vegetable protein for animal feed, after the appearance of Bovine Spongiform Encephalopathy, which led to the prohibition of the use of meat flours for feeding ruminants, and to the need to reduce the external dependence of the livestock farming sector. In consequence, it has been considered of interest to assess the use of grain legumes as protein sources in the diet of lactating goats. The Mediterranean areas of the European Union, and specifically Andalusia, are suitable for growing grain legumes and these, moreover, could contribute to improving soil quality in non-irrigated land by increasing the population of nitrogen-fixing bacteria. In these arid and semi-arid environments, the goat is a very suitable animal for the livestock farmer, with a proven capacity for adaptation to this type of ecosystem, and supplying high-value products. Our interest in goat's milk is mainly centred on its use for the production of cheese, although there also exists the possibility of using it for other dairy products, taking into account not only its nutritional quality but also its recognised benefits for human health. For these reasons, we studied the production and the composition of the milk obtained for human consumption from goats given a diet including grain legumes.

In accordance with the above aims, we determined the chemical composition of the legumes studied (faba beans, lupin, vetch and bitter vetch) and of the diets constituted on this basis; we also examined the characteristics of the degradation taking place in the rumen and of intestinal digestibility, using two different methodologies. Furthermore, for each legume we determined the aminoacid composition of its protein and of its non-degraded fraction. In parallel, assays were performed of the nutritive values derived by lactating goats, analysing the digestive and metabolic utilization of nutrients and the production, composition and technological quality of the milk produced, with respect to the type of diet consumed.

Grain legumes used presented high protein content, with low levels of fats, except in the case of lupin, with majority constituents of linoleic and oleic acids. Tannin content was high, except in lupin, although this did not seem to affect the availability of the protein. A high degree of ruminal degradation of the dry matter and of the protein was observed, both for legumes and in the case of the experimental diets that included them, although in the latter, varying results were obtained, probably because of the interaction between the different ingredients of the diet. The degree of particle loss was considerable, varying between the different legumes and diets, and therefore having differing degrees of effect on the characteristics of their ruminal degradation. The aminoacid composition of the protein of the legume grains was similar in every case. On the other hand, that of the non-degraded fraction in the rumen varied between the different legumes. Multivariate analysis of the results showed that faba beans, vetch and bitter vetch, which belong to the same genus (*Vicia*), presented similar changes after incubation in the rumen, while lupin reacted differently. Nevertheless,

the aminoacids that were most degraded, for all the legumes, were arginine and glutamic acid, while branched-chain aminoacids were most resistant to degradation in the rumen. The use of two different methodologies for estimating the *in situ-in vitro* and *in vitro* intestinal digestibility produced similar results for total protein digestibility, but different ones with respect to the protein that was not degraded in the rumen. However, high values were obtained from the application of both techniques, both for legumes and for the experimental diets.

With respect to the nutritive assessment of the diets in which the different legumes were included, the values obtained were high and similar in every case, both for the digestibility of the different nutrients and for the energy supplied. We studied the metabolic utilization of nitrogen and of energy for milk production, and obtained similar results for the different diets. The utilization of nitrogen in the diets created for this study was in line with that attributed to the legumes included in these diets, taking into account their degradation characteristics, and high levels of urinary nitrogen were measured. The metabolizable nitrogen, which was similar for all the diets assayed, presented different types of partition, i.e. for milk output or retained in the body. The metabolizable nitrogen that was destined for milk production was higher in the diet that included faba beans, while a greater quantity was retained in the diet including bitter vetch.

As concerns milk production, the consumption of the different experimental diets led to production levels that were similar and, in every case, adequate. The composition of the milk produced by the animals given the different experimental diets was also similar, with contents of fat and protein considered normal for goats, including a high proportion of medium-chain triglycerides, which are of special interest for human nutrition. The cheese made from the milk produced by the animals given the different diets also presented comparable characteristics.

The results described in this Dissertation allow us to draw the following conclusions:

1. The degradability in the rumen of the protein from grain legumes and of those in the experimental diets is high. However, for these proteins, might be attributed various values, due to different effects on protein metabolism in the ruminant, taking into account or otherwise, the loss of particles to the degradation characteristics.
2. The protein fraction of the different legumes that are not degraded in the rumen, with respect to their quantitative and qualitative potential as sources of aminoacids that may be absorbed in the intestine, is different from that of the original protein sources. Independently of this, the different non-degraded fractions may supplement the microbial protein in the intestine.
3. Although the estimation method used may influence the values obtained for the intestinal digestibility of total protein and for the protein that is not

degraded in the rumen, values are high both for legumes and for the experimental diets. In consequence, the protein that is not degraded in the rumen would contribute to the pool of aminoacids available for the synthesis of milk protein and for protein retention in the body.

4. For the experimental diets, we recorded high levels of *in vivo* digestibility of the different nutrients and of the energy. For milk production, there were similar levels of utilization of the nitrogen and of the energy contained within the different diets. However, the partition of the metabolizable nitrogen between excretion in the milk and retention in the body was different for the diets that included faba beans and bitter vetch, which could indicate that the quality of the protein might vary, depending on whether it is used for milk production or for retention in the body.
5. The quantity and quality of the milk produced was considered adequate, and similar for the different experimental diets, due to the fact that the latter were isoenergetic and isonitrogenated, and included grain legumes of a similar nature. There was a notably high quantity of medium-chain fatty acids in the milk fat, which reflects one of the reasons why both goat's milk and its derivates could be considered foods of a functional nature.
6. As a similar milk composition was produced from the consumption of the different diets, the technological quality was comparable and, at the same time, adequate.





## **6.BIBLIOGRAFÍA**

---



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Hady E.A., Habiba R.A. 2003. Effect of soaking and extrusion conditions on antinutrients and protein digestibility of legume seeds. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 36: 285-293.
- Abdelgadir I.E.O., Cochran R.C., Titgemeyer E.C., Vanzant E.S. 1996. Comparison of ruminal protein degradability of alfalfa and prairie hay determined in vivo and in vitro via a commercial protease in the presence or absence of cellulase or driselase. *Journal of Animal Science*. 74 (Suppl.1): 79.
- Abreu J.M.F., Bruno-Soares A.M. 1998. Chemical composition, organic matter digestibility and gas production of nine legume grains. *Animal Feed Science and Technology*. 70: 49-57.
- Abijaoudé J.A., Morand-Fehr P., Tessier J., Schmidely P., Sauvant D. 2000. Influence of forage :concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. *Animal Science*. 71:359-368.
- Aerts R.J., Barry T.N., McNabb W.C. 1999. Polyphenols and agriculture: Beneficial effects of proanthocyanidins in forages. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 75: 1-12.
- AFRC, Agricultural and Food Research Council. 1992. Technical Committee on Responses to Nutrients: report no. 9. *Nutrition Abstracts and Reviews*, Series B. 62: 787-835.
- Aguilera J.F. 2001. Aportaciones al conocimiento de la nutrición energética de pequeños rumiantes, con particular referencia al ganado caprino. *Archivos de Zootecnia*. 50: 565-596.
- Aguilera J.F., Bustos M., Molina E. 1992. The degradability of legume seed meals in the rumen: effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology*. 36:101-112.
- Aguilera J.F., Prieto C. 1991. Methane production in goats given diets based on lucerne hay and barley. *Archives of Animal Nutrition*. 41: 77-82.
- Aguilera J.F., Prieto C., Fonollá J. 1990. Protein and energy metabolism of lactating Granadina goats. *British Journal of Nutrition*. 63: 165-175.
- Aguilera J.F., Sanz R., Guerrero E., Molina E. 1984. Posibilidades de sustitución de soja y maíz en dietas para aves. *Archivos de Zootecnia*. 33: 49-75.
- Alonso R., Aguirre A., Marzo F. 2000. Effects of extrusion and tradicional processing methods on antinutrients and in vitro digestibility of protein and starch in faba and kidney beans. *Food Chemistry*. 68:159-165.
- Alonso L., Fontecha J., Lozada L., Fraga M.J., Juárez M. 1999. Fatty acid composition of caprine milk: major, branched-chain, and trans fatty acids. *Journal of Dairy Science*. 82: 878-884.
- Ambrosoli R., DiStasio L., Mazzocco P. 1988. Content of alpha<sub>s1</sub>-casein and coagulation properties in goat milk. *Journal of Dairy Science*. 71: 24-28.

- Antoniewicz A.M., Kosmala I. 1995. Predicting ruminal degradability of lucerne and grass forage protein from *in vitro* solubility with non-specific bacterial protease or pancreatic. *Journal of Animal and Feed Science*. 4: 341-350.
- Antoniewicz A.M., Van Vuuren A.M., Van der Koelen C.J., Kosmala I. 1992. Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of formaldehyde-treated feedstuffs measured by mobile bag and *in vitro* technique. *Animal Feed Science and Technology*. 39: 111-124.
- ANKOM. 1998. Procedures for Fibre and *In vitro* Analysis. Assed a [www.ankom.com](http://www.ankom.com)
- AOAC. 1984. Official methods of analysis, 14<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Ares J.L. 1995. Prospección del sector quesero en Andalucía: Tecnologías tradicionales y aspectos socioeconómicos. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.
- Ares J.L., Ortega J.M., Barriga D., Jiménez L. 1996. Transferencia de tecnologías para la elaboración de quesos madurados de cabra en la provincia de Málaga. Publicaciones de la Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León. 39-43.
- Assoumani M.B., Vedeu F., Jacquot L., Sniffen C.J. 1992. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in foods for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 39: 97-116.
- Atasoglu C., Wallace R.J. 2003. Metabolism and de novo synthesis of amino acids by rumen microbes. En: *Amino Acids in Animal Nutrition*. 2<sup>a</sup> edición. (J.P.F. D'Mello, editor). CAB Internacional.
- Aufrère J., Graviou D., Melcion J.P., Demarquilly C. 2001. Degradation in the rumen of lupin (*Lupinus albus* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) seed proteins. Effect of heat treatment. *Animal Feed Science and Technology*. 92: 216-236.
- Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 88: 9-21.
- Badamana M.S., Sutton J.D. 1992. Hay intake, milk production and rumen fermentation in British Saanen goats given concentrates varying widely in protein concentration. *Animal Production*. 54: 395-403.
- Badamana M.S., Sutton J.D., Oldham J.D., Mowlem A. 1990. The effect of amount of protein in the concentrates on hay intake and rate of passage, diet digestibility and milk production in British Saanen goats. *Animal Production*. 51: 333-342.
- Barrionuevo M., Alférez M.J.M., López Aliaga I., Sanz Sampelayo M.R., Campos M.S. 2002. Beneficial effects of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *Journal of Dairy Science*. 85: 657-664.
- Barry T.N., McNabb W.C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. *British Journal of Nutrition*. 81:263-272.
- Barry T.N., Manley T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *British Journal of Nutrition*. 51: 493-504.

- Barry T.N., Manley T.R., Ducan S.J., 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *British Journal of Nutrition*. 55: 123-137.
- Barroga C.H., Laurena A.C., Mendoza E.M.T. 1985. Effect of condensed tannins on the in vitro protein digestibility of Mung Bean (*Vigna radiata* L.Wilczek). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 33:1157-1161.
- Bauchop T. 1979. The rumen anaerobic fungi: colonizers of plant fibre. *Annales de Recherches Veterinaires*. 10: 246-248.
- Bayourthe C., Moncoulon R., Enjalbert F. 1998. Effect of extruded lupin seeds as a protein source on lactational performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 72: 121-131.
- Bequette B.J., Backwell F.R.C., Crompton L.A. 1998. Current Concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. *Journal of Dairy Science*. 81:2540-2559.
- Bequette B.J., Hanigan M.D., Lapierre H. 2003. Mammary uptake and metabolism of amino acid by lactating ruminants. En: *Amino Acid in Animal Nutrition*. 2<sup>a</sup> Edición. D'Mello.
- Benchaar C., Moncoulon R., Bayourthe C., Vernay M. 1994. Effects of a supply of raw or extruded white lupin seeds on protein digestion and amino acid absorption in dairy cows. *Journal of Animal Science*. 72: 492-501.
- Bickerstaffe R., Noakes D.E., Anninson E.F. 1972. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer into milk fat in the lactating goat, with special reference to the cis- and trans-isomers of octadecenoate and linoleate. *Biochemical Journal*. 130: 607-617.
- Birk Y. 1989. Protein protease inhibitors of plant origin and their significance in nutrition. *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. 83-94 (J. Huisman, T.F.B. van der Poel y I.E. Liener eds). Wageningen: Pudoc.
- Boulanger A., Grosclaude F., Mahé M.F. 1984. Polymorphisme des caséines  $\alpha_{s1}$  et  $\alpha_{s2}$  de la chèvre (*Capra hircus*). *Genetics Selection Evolution*. 16 : 157-175.
- Boza J. 1991. Valor nutritivo de las leguminosas grano en la alimentación humana y animal. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 3: 71-95.
- Boza J. 1993. Planificación ganadera del sureste ibérico. En: *Nutrición de rumiantes en zonas áridas y de montaña y en relación con la conservación del medio natural*. Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca, Colección Congresos y Jornadas. 29/93. pp: 59-66.
- Boza J. 2004. Biodiversidad y seguridad alimentaria. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 17: 93-112.
- Boza J. 2005. Alimentación de la cabra de aptitud láctica. Curso Nutrición de Rumiantes. CIHEAM. Zaragoza.

- Boza J., Sanz Sampelayo M.R. 1997. Aspectos nutricionales de la leche de cabra. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 10: 109-139.
- Broderick G.A. 1987. Determination of protein degradation rates using a rumen *in vitro* system inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition*. 58: 463-473.
- Broderick G.A., Wallace R.J., Ørskov E.R., Hansen L. 1988. Comparison of estimates of ruminal protein degradation by *in vitro* and *in situ* methods. *Journal of Animal Science*. 66: 1739-1745.
- Brun-Bellut J. 1996. Urea recycling in the rumen of dairy goats: effects of physiological stage and composition of intake. *Small Ruminant Research*. 23: 83-90.
- Brun-Bellut J., Blanchart G., Vignon B. 1990. Effects of rumen-degradable protein concentration in diets on digestion, nitrogen utilization and milk yield by dairy goats. *Small Ruminant Research*. 3: 575-581.
- Bryant M.P., Robinson I.M. 1963. Apparent incorporation of ammonia and amino acid carbon during growth of selected species of rumen bacteria. *Journal of Dairy Science*. 46: 150
- Caja G., Bocquier F. 2000. Effects of nutrition on the composition of sheep's milk. *Options méditerranéennes*. 52: 59-74.
- Caja G., Schmidely P. Feeding and milk quality in sheep and goats. 2005. 11 Seminar of the FAO-CIHEAM Sub-Network on Sheep and Goat Nutrition. Catania. Italy.
- Calsamiglia S., Stern M.D. 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *Journal of Animal Science*. 73: 1459-1465.
- Campos M.S., López Aliaga I., Alférez M.J.M., Nestares T., Barrionuevo M. 2003. Effects of goat's and cow's milks on nutritive utilization of calcium and phosphorous in rats with intestinal resection. *British Journal of Nutrition*. 90: 61-67.
- Cardozo P., Calsamiglia S., Ferret A. 2000. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science* 83 (suppl. 1): 265.
- Cardozo P., Calsamiglia S., Ferret A. 2002. Effects of pH on nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system fed a high concentrate diet. *Journal of Dairy Science* 85 (suppl. 1): 182.
- Carro M.D., Lebzien P., Rohr K. 1995. Effects of pore size of nylon bags and dilution rate on fermentation parameters in a semi-continuous artificial rumen. *Small Ruminant Research*. 15: 113-119.
- Carro M.D., López S., Valdes C., Gonzalez J.S. 1999. Effect of nitrogen form (casein and urea) on the *in vitro* degradation of cell walls from six forages. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition-Zeitschrift Fur Tierphysiologie Tierernahrung Und Futtermittelkunde*. 81 : 212-222.

- Casper D.P., Schingoethe D.J. 1989. lactational response of dairy cows to diets varying in ruminal solubilities of carbohydrate and crude protein. *Journal of Dairy Science*. 72: 928-941.
- Castanon J.I.R., Perez-Lanzac J. 1990. Substitution of fixed amounts of soyabean meal for field beans (*Vicia faba*), sweet lupins (*Lupinus albus*), Cull peas (*Pisum sativum*) and vetchs (*Vicia sativa*) in diets for high performance laying leghorn hens. *British Poultry Science*. 31: 173-180.
- Cecava M.J., Merchen N.R., Gay L.C., Berger L.L. 1990. Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation techniques. *Journal of Dairy Science*. 73: 2480
- Chatfield C., Collins A.J. 1980. Introduction to Multivariate Analysis. Chapman and Hall. Londres.
- Champ M.J. 2002. Non-nutrient bioactive substances of pulses. *British Journal of Nutrition*. 88: 307-319.
- Chandan R.C., Attaie R., Sahani K.M. 1992. Nutritional aspects of goat milk and its products. *Proceedings of V International Conference on goats*. Nueva Delhi, India. Vol II. Part I. 399-420.
- Chianese L., D'Auria R., Ferranti P., Garro G., Mauriello R., Rubino R., Addeo F. 1995. Occurrence of novel  $\alpha_{s1}$ -casein variants in Italian goat breeds. Seminar on Production and Utilization of ewes and goats milk. Federación Internacional de Lechería. Limmin-Hersonissos, Creta (Grecia).
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R.M, Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie*. 49:181-205.
- Chilliard Y., Ferlay A., Rouel J., Lamberet G. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *Journal of Dairy Science*. 86: 1751-1770.
- Christensen R.A., Lynch G.L., Clark J.H. 1993. Influence of amount and degradability of protein on production of milk and milk components by lactating holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 76:3490-3496.
- Clark J.H., Davis C.L. 1980. Some aspects of feeding high producing dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 63: 873.
- Clark J.H., Davis C.L. 1983. Future improvement of milk production: potential for nutritional improvement. *Journal of Animal Science*. 57: 750.
- Clark J.H., Klusmeyer T.H., Cameron M.R. 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 75: 2304-2323.
- Clark S., Sherbon J.W. 2000. Genetic variants of  $\alpha_{s1}$ -CN in goat milk: breed distribution and associations with milk composition and coagulation properties. *Small Ruminant Research*. 38:135-143.
- Cohen S.A., Meys M., Tarvin, T.L. 1989. The Pico-Tag Method. A manual of advanced techniques for amino acid analysis. Millipore Corporation Bedford, MA.

- Crooker B.A., Clark J.H., Shanks R.D., Hatfield E.E. 1986. Effects of ruminal exposure on the amino acid profile of heated and formaldehyde-treated soybean meal. *Journal of Dairy Science*. 69: 2648-2657.
- Cooper P.B., Ling J.R. 1985. The uptake of peptides and amino acids by rumen bacteria. *Proceedings of Nutrition Society*. 44: 144.
- Cros P., Benchaar C., Bayourthe C., Vernay M., Moncoulon R. 1991. In situ evaluation of the ruminal and intestinal degradability of extruded whole lupin seed nitrogen. *Reproduction, Nutrition, Development*. 31: 575-583.
- Cros P., Moncoulon R., Bayourthe C., Vernay M. 1992. Effect of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of amino acids in white lupin seed. *Canadian Journal of Animal Science*. 72: 89-96.
- Cros P., Vernay M., Bayourthe C., Moncoulon R. 1992. Influence of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of amino acids in whole horse bean. *Canadian Journal of Animal Science*. 72: 359-366.
- Cubero J.L. 1983. Origen, evolución y mejora genética de las leguminosas grano. En: *Leguminosas de grano*. (Eds. J.L. Cubero, M.T. Moreno), Ediciones Mundiprensa, Madrid, 35-51.
- Czerkawski J.W., Breckenridge G. 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique (Rusitec). *British Journal of Nutrition*. 38: 371-389.
- Danesh Mesgaran M., Stern M.D. 2005. Ruminal and post-ruminal protein disappearance of various feeds originating from Iranian plant varieties determined by the in situ mobile bag technique and alternative methods. *Animal Feed Science and Technology*. 118: 31-46.
- De la Torre Adarve M.G. 2006. Interacción entre el genotipo de la  $\alpha_{s1}$ -caseína y el nivel de proteína de la dieta. Utilización nutritiva, producción y composición de la leche de cabras de raza Malagueña. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- D'Mello J.P.F. 1992. Chemical constraints to the use of tropical legumes in animal nutrition. *Animal Feed Science and Technology*. 38: 237-261.
- DePeters E.J., Cant J.P. 1992. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *Journal of Dairy Science*. 75:2043-2070.
- Devant M., Ferret A., Calsamiglia S., Casals R., Gasa J. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *Journal of Animal Science*. 79: 1944-1953.
- Díaz E., Analla M., Muñoz-Serrano A., Alonso-Moraga A., Serradilla J.M. 1999. Variation of milk yield and contents of total casein and casein fraction in Murciano-Granadina goats. *Small Ruminant Research*. 34: 141-147.
- Dijkstra J. 1994. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. *British Journal of Nutrition*. 72: 679-699.
- Dixon R.M., Hosking B.J. 1992. Nutritional value of grain legumes for ruminants. *Nutrition Research Reviews*. 5: 19-43.
- Doreau M., Chilliard Y. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *British Journal of Nutrition*. 78: 515-535.



- Doreau M., Ferlay A. 1994. Digestion and utilisation of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 45:379-396.
- Duranti M., Gius C. 1997. Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field Crops Research*. 53: 31-45.
- Eliman M.E., Ørskov E.R. 1984. Factors affecting the outflow of protein supplement from the rumen. *Animal Production*. 38: 45-51.
- Elgersma A., Tamminga S., Ellen G. 2006. Modifying milk composition through forage. *Animal Feed Science and Technology*. En prensa.
- Emery R.S. 1978. Feeding for increased milk protein. *Journal of Dairy Science*. 61:825-828.
- Endres M.I., Stern M.D. 1993. Effects of pH and diets containing various levels of lignosulfonate-treated soybean meal on microbial fermentation in continuous culture. *Journal of Dairy Science*. 76: 177.
- FAOSTAT .Base de datos estadísticos de la FAO. <http://faostat.fao.org>.
- Faverdin P. 1999. The effect of nutrients on feed intake in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58: 523-531.
- Fernández C., Rubert Alemán J., Sánchez Séiquer P. 2004. Effect of two sources of protein on performance in Murciano-Granadina goats during lactation. *Options Mediterranees*. 59: 79-83.
- Fernández C., Sánchez Séiquer P., Sánchez A. 2003. Use of total mixed rations with three sources of protein as an alternative feeding for dairy goats on southeast of Spain. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2 (1): 18-24.
- Forbes J.M. 1995. Prediction of voluntary intake. En: *Voluntary food intake and diet selection in farm animals*. (J.M. Forbes ed). CAB. Internacional Wallingford. Reino Unido. 384-415.
- Forsberg C.W., Lovelock L.K.A., Krumholz L., Buchanan-Smith J.G. 1964 Protease activities of rumen protozoa. *Applied Environmental Microbiology*. 47:101.
- Frabe A. 1997. Perspectives actualles d'utilisation du lait de chevre dans l'alimentation infantile. En: *Proceedings de Colloque Interets Nutritionnel et Dietetique du Lait de chevre*. Vol 81. INRA. Paris, Francia. pp: 123-126.
- France J., Siddons R.C. 1993. Volatile fatty acids production. En: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism* (Forbes J.M.,France J. eds). CAB International. Wallingford, UK. pp: 107-121.
- Fredeen A.H. 1996. Considerations in the nutritional modification of milk composition. *Animal Feed Science and Technology*. 59: 185-197.
- Froidmont E., Bartiaux-Thill N. 2004. Suitability of lupin and pea seeds as a substitute for soybean meal in high-producing dairy cow feed. *Animal Research*. 53: 475-487.
- Gargallo S., Calsamiglia S., Ferret A. 2006. Technical note: A modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science*. 84: 2163-2167.
- García Unciti M.S. 1996. Utilidad terapéutica de los triglicéridos de cadena media (MCT). Dietas cetogénicas en la epilepsia infantil. *Nutrición Clínica*. 16:7-35.

- García M.A., Aguilera J.F., Molina Alcaide E. 1995. Voluntary intake and kinetics of degradation and pasaje of unsupplemented and supplemented pastures from semiarid lands in grazing goats and sheep. *Livestock Production Science*. 44: 245-255.
- Garrido A., Gómez-Cabrera A., Guerrero J.E., Van der Meer J.M. 1991. Effects of treatment with polyvinylpyrrolidone and polyethylene glycol on Faba bean tannins. *Animal Feed Science and Technology*. 35: 199-203.
- Gatel F. 1994. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Animal Feed Science and Technology*. 45: 317-348.
- Gerson T., John A., King A.S.D. 1985. The effects of dietary starch and fibre on the in vitro rates of lipolysis and hydrogenation by sheep rumen digesta. *Journal of Agricultural Science*. 105: 27-30.
- Giger-Reverdin S., Le Pierres J.L., Duvaux-Ponter C., Morand-Fehr P., Tessier J., Dupas G., Martin O., Rouzeau A., Sauvant D. 2004. Influence of the degree of dietary fatty acid unsaturation on rumen fermentation parameters. *Options Méditerranéennes*. 59 : 67-71
- Givens D.I., Shingfield K.J. 2004. Foods derived from animals: the impact of animal nutrition on their nutritive value and ability to sustain long-term health. *Nutrition Bulletin*. 29: 325-332.
- Goelema J.O., Spreeuwenberg M.A.M., Holf G., Van der Poel A.F.B., Tamminga S. 1998. Effect of pressure toasting on the rumen degradability and intestinal digestibility of whole and broken peas, lupins and faba beans and a mixture of these feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 76: 35-50.
- González-Carbajo A., Pérez-Lanzac J., Corcuera P. 1978. El marco general de la demanda de alimentos concentrados por la ganadería española y sus proyecciones para 1983. ITEA, 33,13.
- González J., Andrés S. 2003. Rumen degradability of some legume seeds. *Animal Research*. 52: 17-25
- Griinari J.M., Bauman D.E. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk ruminants. *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol 1 (M. Yurawecz, M. Mossoba, J. Kramer, M. Pariza, G. Nelson. eds.) 180-200, American Oil Chemists Society Press, Champaign, IL.
- Grosclaude F., Mahé M. F., Brignon G., Di Stasio L., Jeunet R. 1987. A mendelian polymorphism underlying quantitative variations of goat  $\alpha_{s1}$ -casein. *Genetics Selection Evolution*. 19: 399-411.
- Grosclaude F., Ricordeau G., Martin P., Remeuf F., Vassal L., Bouillon J. 1994. Du gène au fromage : le polymorphisme de la caséine  $\alpha_{s1}$  caprine, ses effets, son évolution. INRA. *Production Animale*. 7 : 3-19.
- Grzesiak T. 1997. Lait de chevre, lait d'avenir pour les nourrissons. En : Proceedings de Colloque Interets Nutritionnel et Dietetique du Lait de chevre. Vol 81. INRA. Paris, Francia. pp: 127-148.
- Guedes CM., Dias da Silva A. 1996. Cinétique de la dégradation dans le rumen de la matière sèche et de l'azote de graines de légumineuses méditerranéennes. *Annales de Zootechnie*. 45: 423-435.

- Guillaume B., Otterby D.E., Stern M.D., Johnson D.G. 1987. Comparison of sweet lupin seeds with soybean meal as a protein supplement for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 70: 2339-2348.
- Guillon F., Champ M.M.J. 2002. Carbohydrate fractions of legumes : uses in human nutrition and potential for health. *British Journal of Nutrition*. 88: 293-306.
- Gulati S.K., Byers E.B., Byers Y.G, Ashes J.R, Scott T.W. 1997. Effects of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk. *Animal Feed Science and Technology*. 66: 159-164.
- Gulati S.K., Kitessa S.M., Ashes J.R., Fleck E., Byers E.B., Byers Y.G., Scott T.W. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Animal Feed Science and Technology*. 86: 139-148.
- Guo M., Park Y.W., Dixon P.H., Gilmore J.A., Kindstedt P.S. 2004. Relationship between the yield of cheese (Chevre) and chemical composition of goat milk. *Small Ruminant Research*. 52: 103-107.
- Guyonnet J.P. 1999. L'Optigraph. Un remplaçant pour du Formagraph. *Revue Laitiere Française*. 595, 36-37.
- Haddad S.G. 2006. Bitter vetch grains as a substitute for soybean meal for growing lambs. *Livestock Production Science*. 99: 221-225.
- Hadjipanayiotou M. 1987. Studies on the response of lactating Damascus goats to dietary protein. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 57:41-52.
- Hadjipanayiotou M. 1995. Composition of ewe, goat and cow milk and of colostrums of ewes and goats. *Small Ruminant Research*. 18: 255-262.
- Hadjipanayiotou M., Economides S. 2001. Chemical composition, in situ degradability and amino acid composition of protein supplements fed to livestock and poultry in Cyprus. *Livestock Research for Rural Development*. 13 (6).
- Hadjipanayiotou M., Economides S., Koumas A. 1985. Chemical composition, digestibility and energy content of leguminous grains and straws grown in a Mediterranean region. *Annales de Zootechnie*. 34: 23-30.
- Haenlein G.F.W. 2004. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research*. 51: 155-163.
- Harfoot C.G., Hazlewood G.P. 1988. Lipid metabolism in the rumen. En: *The Rumen Microbial Ecosystem*. Ed: Hobson P.N. London y New York: Elsevier Applied Science. pp: 285-322.
- Henning P.H., Steyn D.G., Meissner H.H. 1991. The effect of energy and nitrogen supply pattern on rumen bacterial growth in vitro. *Animal Production*. 53: 165-175.
- Herrera Saldana R., Gómez Alarcón M., Torabi Huber J.T. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial synthesis. *Journal of Dairy Science*. 73: 142-152.
- Hervás G., Frutos P., Giráldez F.J., Mantecón A.R., Álvarez del Pino M.C. 2001. Effect of different doses of quebracho tannins extracto on rumen fermentation in ewes. *Animal Feed Science and Technology*. 109:65-78.

- Hoover W.H., Crooker B.A., Sniffen C.J. 1976. Effects of differential solid-liquid removal rates on protozoa numbers in continuous cultures of rumen contents. *Journal of Animal Science*. 43: 528-534.
- Hoover W.H., Stokes S.R. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *Journal of Dairy Science*. 74: 3630-3644.
- Hristov A., Broderick G.A. 1994. In vitro determination of ruminal protein degradability using [<sup>15</sup>N]-ammonia to correct for microbial nitrogen uptake. *Journal of Animal Science*. 72: 1344-1354.
- Hungate R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes*. Academic Press, New York. p. 533.
- Huntington J.A., Givens D.I. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)*. 65: 63-93.
- Hvelplund T., Weisbjerg M.R. 1998. In vitro techniques to replace in vivo methods for estimating amino acid supply. Occasional publication. No 22. *British Society of Animal Science*.
- Hvelplund T., Weisbjerg M.R. 2000. In situ techniques for the estimation of protein degradability and post rumen availability. En: *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. (Eds. D.I. Givens, E. Owen, R.F.E. Axford y H.M. Omed). CAB International, 233-258.
- INRA 1988. *Alimentation des Bovins, Ovins, et Caprins* (Ed. R. Jarrige). Paris: INRA p. 370.
- Isac M.D., García M.A., Aguilera J.F., Molina Alcaide E. 1994. A comparative study of nutrient digestibility, Kinetics of digestion and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheep offered medium quality forages at the maintenance level of feeding. *Archives of Animal Nutrition*. 46: 37-50.
- Ismartoyo. 2001. Rumen microbial degradation in vitro of a selection of tropical legume seeds incubated in consecutive batch culture (CBC). *Buletin Ilmu Peternakan dan Perikanan*. VII (2).
- Jadhav S.J., Reddy N.R., Desphande S.C. 1989. Polyphenols. En: *Handbook of World Food Legumes: Nutritional Chemistry, Processing Technology and Utilization*. (Salunke D.K. y Kadam S.S. eds.). Boca Raton, FL: CRC Press. Vol 1. pp: 145-165.
- Jandal J.M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 22:177-185.
- Jenness R. 1979. Comparative aspects of milk proteins. *Journal of Dairy Research*. 46: 197-210.
- Jennes R. 1980. Composition and characteristics of goat milk: Review 1968-1979. *Journal of Dairy Science*. 63: 1605-1630.
- Jones W.T., Mangan J.L. 1977. Complexes of the condensed tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) with fraction 1 leaf protein and with submaxillary mucoprotein, and their reversal by polyethylene glycol and pH. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 28: 126-136.

- Jung Hoon Lee, Govind Kannan, Brou Kouakou. 2006. Concentration and distribution of conjugated linoleic acids and trans-fatty acids in small ruminant milk and meat lipids. *Journal of Food Lipids*. 13: 100-111.
- Kadzere C.T., Jingura R. 1993. Digestibility and nitrogen balance in goats given different levels of crushed whole soybeans. *Small Ruminant Research*. 10: 175-180.
- Kalscheur K.F., Vandersall J.H., Erdman R.A., Kohn R.A., Russek-Cohen E. 1999. Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 82:545-554.
- Kamra D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89: 124-135.
- Kawas J.R., Lopes J., Danelon D.L., Lu C.D. 1991. Influence of forage to concentrate ratios on intake, digestibility, chewing and milk production of dairy goats. *Small Ruminant Research*. 4:11-18.
- Kibelolaud A.R., Vernay M., Bayourthe C., Moncoulon R. 1993. Effect of extruding on ruminal disappearance and lower gastrointestinal tract digestion of white lupin seeds. *Canadian Journal of Animal Science*. 73: 571-579.
- Kibelolaud A.R., Vernay M., Bayourthe C., Moncoulon R., Cros P. 1991. Estimation in situ chez le ruminant de la valeur azotée du lupin en fonction de la qualité du broyage et de la taille des particules. *Annales de Zootechnie*. 40 (4) : 247-257.
- Kim Ha J., Lindsay R.C. 1991. Contributions of cow, sheep, and goat milks to characterizing branched-chain fatty acid and phenolic flavors in varietal cheeses. *Journal of Dairy Science*. 74:3267-3274.
- Kohn R.A., Allen M.S. 1995. *In vitro* protein degradation of feeds using concentrated enzymes extracted from rumen contents. *Animal Feed Science and Technology*. 52: 15-28.
- Lajolo F.M., Genovese M.I., Pryme I.F., Dale T.M. 2004. Beneficial (antiproliferative) effects of different substances. En: Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and oilseeds. EAAP publication. Muzquiz M., Hill G.D., Cuadrado C., Pedrosa M.M., Burbano C. editores. Toledo (España).
- Laurena A.C., Truong V.D., Mendoza E.M.T. 1984. Effects of condensed tannins on the in vitro protein digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata* L.Walp). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 32:1045-1048.
- Landau S., Perevolotsky A., Kababya D., Silanikove N., Nitsan R., Baram H., Provenza F. 2002. Polyethylene glycol affects goats' feeding behaviour in a tannin-rich environment. *Journal of Range Manage*. 55: 598-603.
- Landau S., Xue B., Dvash L., Friedman S., Mabweesh S.J. 2003. Polyethylene glycol used to alleviate the negative effects of dietary tannins, can also serve as a marker of fecal output in goats. *Small Ruminant Research*. 48: 37-43.
- Lee H., Lee I. 2002. A study on the dry matter yield and nutritive values of wild Korean lespedeza (*Lespedeza atipulacea* Maxim.). *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 15:396-400.

- LeDoux M., Rouzeau A., Bas P., Sauvant D. 2002. Occurrence of trans-C<sub>18:1</sub> fatty acid isomers in goat milk : effect of two dietary regimens. *Journal of Dairy Science*. 85:190-197.
- Liener I.E. 1980. Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. 2° edición. Academic Press. New Cork. pp 502.
- Ling J.R., Armstead I.P. 1995. The in vitro uptake and metabolism of peptides and amino acids of five species of rumen bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*. 78:116-124.
- López Aliaga I., Alférez M.J.M., Barrionuevo M., Nestares T., Sanz Sampelayo M.R., Campos M.S. 2003. Study on nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *Journal of Dairy Science*. 86: 2958-2966.
- Lu C.D., Kawas J.R., Mahgoub O.G. 2005. Fibre digestion and utilization in goats. *Small Ruminant Research*. 60: 45-52
- Lykos T., Varga G.A. 1995. Effects of processing methods on degradation characteristics of protein and carbohydrate sources in situ. *Journal of Dairy Science*. 78 : 1789-1801.
- Mackie R.I., Gilchrist F.M., Roberts A.M., Hannah P.E., Schwartz H.M. 1978. Microbiological and chemical changes in the rumen during the stepwise adaptation of sheep to high concentrate diets. *Journal of Agricultural Science*. Cambridge. 241-254.
- Mackie R.I., White B.A. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *Journal of Dairy Science*. 73: 2971-2995.
- Madsen J., Hvelplund T. 1985. Protein degradation in the ruminant. A comparison between in vivo, nylon bag, in vitro and buffers measurements. *Acta de Agriculture Scan*. Suppl. 25, 103-124.
- Madsen J., Hvelplund T. 1994. Prediction of in situ protein degradability in the rumen. Results of a european ringtest. *Livestock Production Science*. 39: 201-212.
- Madsen J., Hvelplund T., Weisbjerg M.R., Bertilsson J., Olsson I., SPÖRNDLY R., Harstad O.M., Volden H., Tuori M., Varvikko T., Huhtanen P., Olafsson B.L. 1995. The AAT/PBV protein evaluation system for ruminants. A revision. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*. Supplement No. 19. 37 pgs.
- Mahadevan S., Erfle J.D., Sauer F.D. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bactaroides amylophilus* protease and by rumen micro-organisms. *Journal of Animal Science*. 50: 723-728.
- Mahadevan S., Sauer F.D., Erfle J.D. 1987. Preparation of protease from mixed rumen microorganisms and its use for the in vitro determination for the degradability of true protein in feedstuffs. *Canadian Journal of Animal Science*. 67: 55-64.
- Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich diets. *Small Ruminant Research*. 49:241-256.

- MAPA. 2006. Anuario de Estadística Agroalimentaria 2004. [www.mapa.es](http://www.mapa.es).
- Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*. 1: 209-231.
- Mansfield H.R., Endres M.I., Stern M.D. 1995. Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*. 55: 47-66.
- Martin P., Addeo R. 1996. Genetic polymorphism of casein in the milk of goats and sheep. En: Production and Utilization of Ewe and Goat Milk. Proc. of the IDF/Greek National Committee of IDF/CIRVAL Seminar, Creta, Grecia. Pp: 45-58.
- Martínez T.F., Moyano F.J., Díaz M., Barroso F.G., Alarcón F.J. 2004. Ruminal degradation of tannin-treated legume meals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:1979-1987.
- Masoero F., Pulimeno A.M., Rossi F. 2005. Effect of extrusion, expansion and toasting on the nutritional value of peas, faba beans and lupins. *Italian Journal of Animal Science*. 4: 177-189.
- Massart-Leen A.M., De Pooter H., Decloedt M., Schamp N. 1981. Composition and variability of the branched-chain fatty acid fraction in the milk of goats and cows. *Lipids*. 16: 286-292.
- Masson C. 1981a. Utilisation des graines protéagineuses dans l'alimentation de la chèvre en début de lactation. *Annales de Zootechnie*. 30 (4) : 435-442.
- Masson C. 1981b. Utilisation des graines protéagineuses dans l'alimentation de la chèvre laitières. En : *Nutrition et systèmes d'alimentation de la chèvre*. ITOVIC. INRA Syposium International. Tours (Francia).
- Masucci F., Di Francia A., Romano R., Maresca di Serracapriola M.T., Lambiase G., Varricchio M.L., Proto V. 2006. Effect of *Lupinus albus* as protein supplement on yield, constituents, clotting properties and fatty acid composition in ewes' milk. *Small Ruminant Research*. 65: 251-259.
- Matras J., Bartle S.J., Preston R.L. 1991. Nitrogen utilization in growing lambs: Effects of grain (starch) and protein sources with various rates of ruminal degradation. *Journal of Animal Science*. 69: 339-347.
- May M.G., Otterby D.E., Linn J.G., Hansen W.P. 1993. Lupins (*Lupinus albus*) as a protein supplement for lactating Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 76: 2682-2691.
- McAllister T.A., Bae H.D., Jones G.A., Cheng K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of Animal Science*. 72: 3004-3018.
- McDonal P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. 1995. Microbial digestion in ruminants and others herbivores. En: *Animal Nutrition*. 5ª edición. 156-
- McNiven M.A., Prestlokken E., Mydland L.T., Mitchell A.W. 2002. Laboratory procedure to determine protein digestibility of heat-treated feedstuffs for dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 96: 1-13.

- McSweeney C.S., Palmer B., McNeill D.M., Krause D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 83-93.
- Mehanso H., Butler L.G., Carlson D.M. 1987. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction and defense mechanisms. *Annual Review of Nutrition*. 7: 423-440.
- Michalet-Doreau B., Ould-Bah M.Y. 1992. In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen : a review. *Animal Feed Science and Technology*. 40: 57-86.
- Min B.R., Barry T.N., Attwood G.T., McNabb W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 106:3-19.
- Mishra S., Rai S.N. 1996a. Effects of different RDP and UDP ratios on voluntary intake, milk production and feed conversion efficiency in lactating goats. *Small Ruminant Research*. 20: 31-38.
- Mishra S., Rai S.N. 1996b. Influence of varying RDP:UDP ratios in diets on digestion, nitrogen utilization and milk production efficiency in goats. *Small Ruminant Research*. 20: 39-45.
- Molina Alcaide E., Martín García A.I., Aguilera, J.F. 2000. A comparative study of nutrient digestibility, Kinetics of degradation and passage and rumen fermentation pattern in goats and sheeps offered good quality diets. *Livestock Production Science*. 64: 215-223.
- Molina E., Sanz R., Boza J., Aguilera J. 1983. Utilización de la semilla de altramuz blanco (*Lupinus albus* var. multulupa) en dietas para pollos en crecimiento, como sustitutivo de la torta de soja. Estudio de su valor energético. *Archivos de Zootecnia*. 32: 295-304.
- Molina Alcaide E., Weisbjerg M.R., Hvelplund T. 1996. Degradation characteristics of shrubs and the effect of supplementation with urea or protein on microbial production using a continuous cultura system. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 75: 121-132.
- Moore S. 1963. On the determination of cystine as cysteic acid. *J. Biol. Chem.* 238: 235-237.
- Morand-Fehr. 2005. Recent developments in goat nutrition and application: A review. *Small Ruminant Research*. 60: 25-43.
- Morand-Fehr P., Bas P., Blanchart G., Daccord R., Giger-Reverdin S., Gihad E.A., Hadjipanayiotou M., Mowlen A., Remeuf F., Sauvant D. 1991. Influence of feeding on goat milk composition and technological characteristic. En: *Goat Nutrition*. 209-224. Wageningen
- Morand-Fehr P., Chilliard Y., Sauvant D. 1982. Goat milk and its components: secretary mechanism and influence of nutritional factors. 3<sup>rd</sup> International Conference on goat production and disease. Tucson, Arizona (USA). pp: 113-121.
- Morand-Fehr P., Sanz Sampelayo M.R., Fedele Y.V., Le Frileux Y., Eknaes M., Schmidely P.H., Giger Reverdin S., Bas P., Rubino R., Havrevoll Ø, Sauvant D. 2000. Effects of feeding on the quality of goat milk and cheeses. 7<sup>th</sup> International Conference on Goats. Francia, 15-21 Mayo pg 53-58.



- Moreno M.T. 1983. Las leguminosas de grano: una visión de conjunto. En: Leguminosas de grano. (Cubero, J.L., Moreno, M.T. eds.), Ediciones Mundiprensa, Madrid, 15-35.
- Moss A.R., Deaville E.R., Givens D.I. 2001. The nutritive value for ruminants of lupin seeds from determinate and dwarf determinate plants. *Animal Feed Science and Technology*. 94: 187-198.
- Murphy J. J. 2001. Milk Fat Composition and Nutritional Value. Teagasc, Dairy Production Research Centre, Moorepark, Fermoy, Co Cork, Ireland. 255-257.
- Murphy S.R., McNiven M.A. 1994. Raw or roasted lupin supplementation of grass silage diets for beef steers. *Animal Feed Science and Technology*. 46: 23-35.
- Murphy J.J., O'Mara F. 1993. Nutritional manipulation of milk protein concentration and its impact in the dairy industry. *Livestock Production Science*. 35: 117-134
- Nadal Moyano S., Moreno Yangüela M.T., Cubero Salmerón J.I., 2004a. Las leguminosas grano: una visión de conjunto. En: *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Ed. Mundi-prensa. Madrid. pp: 27-44.
- Nadal Moyano S., Moreno Yangüela M.T., Cubero Salmerón J.I., 2004b. Calidad. En: *Las leguminosas grano en la agricultura moderna*. Ed. Mundi-prensa. Madrid. pp: 85-91.
- Newbold J.R., Rust S.R. 1992. Effect of asynchronous nitrogen and energy supply on growth of ruminal bacteria in batch culture. *Journal of Animal Science*. 70: 538-546.
- Nocek J.E., Russell J.B. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*. 71: 2070-2107.
- NRC, National Research Council. (1981). Nutrient requirements of goats. Angora, dairy and meat goat in temperate tropical countries. En. *Nutrient requirements of domestic animales*. Number 15, Washington DC, USA, National Academic Press.
- NRC, National Research Council 1985. *Ruminant Nitrogen Usage*. Washington: US National Academy of Science.
- O'Mara F.P., Murphy J.J., Rath M. 1997. The amino acid composition of protein feedstuffs before and after ruminal incubation and after subsequent passage through the intestines of dairy cows. *Journal of Animal Science*. 1997. 75: 1941-1949.
- Onodera R., Nakagawa Y., Kandatsu M. 1977. Ureolytic activity of the washed suspension of rumen ciliated protozoa. *Agriculture Biological Chemistry*. 41: 2177-2182.
- Ørskov E.R., McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 92: 499-503.
- Orpin C.G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology*. 10:121-143.
- Pailan G.H., Kaur H. 1996. Influence of dietary protein content and digestibility on milk yield and blood constituents in lactating goats. *Small Ruminant Research*. 20:47-51.

- Park Y.W. 1992. Comparison of buffering components in goat and cow milk. *Small Ruminant Research*. 8: 75-81.
- Park Y.W. 1994. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Ruminant Research*. 14: 151-159.
- Park Y.W., Mahoney A.W., Hendricks D.G. 1986. Bioavailability of iron in goat milk compared with cow milk fed to anemics rats. *Journal of Dairy Science*. 69: 2608-2615.
- Parodi P.W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents in bovine milk. *Journal of Dairy Science*. 82 : 1339-1349.
- Pépin L. 1995. Recherche de polymorphisme génétique chez les caprins. Applications à l'étude de la diversité des populations, au contrôle de filiation et à la résistance génétique à la coudriose. Tesis Doctoral. Universidad de París.
- Pérez Maldonado R.A., Norton B.W. 1996. Digestion of 14 C-labelled condensed tannins from *Desmodium intortum* in sheep and goats. *British Journal of Nutrition*. 76: 501-513.
- Pérez Martínez L., 1995. Determinación cromatográfica de aminoácidos previa reacción con fenilocianato. Influencia de b-glucanasas sobre la digestibilidad de aminoácidos. *Tesis Doctoral*, Universidad de Granada.
- Pierre A., Michel F., Le Graet Y. 1995. Variation in size of goat milk casein micelles related to casein genotype. *Lait*. 75: 489-502.
- Podleski W.K. 1992. Milk protein sensitivity and lactose intolerante with special refrénesa to goat milk. *Proceedings of V International Conference on goats*. Nueva Delhi, India. Vol II. Part I. 610-613.
- Posati L.P., Orr M.L. 1976. Composition of Foods, Dairy and Egg Products. En: *Agriculture Handbook*. No 8-1. USDA-ARS, Consumer and Food Economics Institute Publishers. Washington D.C. pp: 77-109.
- Poveda J.M., Cabezas L. 2006. Free fatty acid composition of regionally-produced Spanish goat cheese and relationship with sensory characteristics. *Food Chemistry*. 95: 307-311.
- Precht D., Molquentin J. 1996. Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. *International Dairy Journal*. 6: 791-809.
- Prestlökken E. 1999. In situ ruminal degradation and intestinal digestibility of dry matter and protein in expanded feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*. 77: 1-23.
- Prevot S., Senaud J., Bohatier J., Prensier G., 1994. Variation in the composition of the ruminal bacteria microflora during the adaptation phase in an artificial fermenter (Rusitec). *Zoological Science*. 11: 871-882.
- Prieto C., Aguilera J.F., Lara L., Fonollá J. 1990. Protein and energy requirements for maintenance of indigenous Granadina goats. *British Journal of Nutrition*. 63: 155-63.
- Priolo A., Ben Salem H. 2004. Effects of dietary condensed tannins on small ruminant productions. *Options Mediterranees*. 59: 209-213.

- Provenza F.D., Malechek J.C. 1984. Diet selection by domestic goats in relation to black-brush twig chemistry. *Journal of Applied Ecology*. 21: 831-841.
- Purroy y Surra. 1990. Empleo de guisantes y de habas en el pienso para cebo de corderos. *Archivos de Zootecnia*. 39. 143:59-66.
- Putzai A. 1989. Biological effects of dietary lectins. En: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legume Seeds*. Huisman J., Van der Poel T.F.B., Liener, I.E., editores. Wageningen: Pudoc.
- Raynal-Ljutovac K., Gaborit P., Lauret A. 2005. The relationship between quality criteria of goat milk, its technological properties and the quality of the final products. *Small Ruminant Research*. 60: 167-177.
- Reinert P., Frabe A. 1997. Utilisation du lait de chevre chez l'enfant. Experience de Creteil. En : *Proceedings de Colloque Interets Nutritionnel et Dietetique du Lait de chevre*. Vol 81. INRA. Paris, Francia. pp: 119-121.
- Remeuf F. 1993. Influence du polymorphisme génétique de la caséin  $\alpha_{s1}$  caprine sur les caractéristiques physico-chimiques et technologiques du lait. *Lait*. 73 : 549-557.
- Rémond D., Le Guen M.P., Poncet C. 2003. Degradation in the rumen and nutritional value of lupin (*Lupinus albus* L.) seed proteins effect of extrusion. *Animal Feed Science and Technology*. 105: 55-70.
- Robinson P.H., McNiven M.A. 1993. Nutritive value of raw and roasted sweet white lupins (*Lupinus albus*) for lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 43: 275-290.
- Rodehutsord M., Young P., Phillips N., White C.L. 1999. Wool growth in Merino wethers fed lupins untreated or treated with heat or formaldehyde, with and without a supplementation of rumen protected methionine. *Animal Feed Science and Technology*. 82: 213-226.
- Rosenblum A.H., Rosenblum P. 1952. Gastrointestinal allergy in infancy. Significance of eosinophiles in the stools. *Pediatrics*. 9: 311-319.
- Rubio L. 2002. Los retos de la nutrición animal en el tercer milenio: calidad y seguridad de los alimentos de origen animal. Curso de la Universidad Internacional de Andalucía, Baeza.
- Ryan C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: gene for improving defensas against insects pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*. 28: 425-449.
- Russel J.B., O'Connor J.D., Fox D.G., Van Soest P.J., Sniffen C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets.I. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science*. 70: 3551-3561.
- Russell J.B., Rychlik J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*. 292: 1119-1122.
- Russel J.B., Strobel H.J. 1993. Microbial Energetics. En *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Forbes J.M y France J. Editores. CAB Internacional, Wallingford, Oxon, UK. p. 145-163.
- Sahlu T., Fernández J.M., Jia Z.H., Akinsoyinu A.O., Hart S.P., Teh T.H. 1993. Effect of source and amount of protein on milk production in dairy goats. *Journal of Dairy Science*. 76: 2701-2710.

- Saini A.L., Gill R.S. 1991. Goat milk: An attractive alternate. *Indian Dairyman*. 42: 562-564.
- Santini F.J., Lu C.D., Potchoiba M.J., Coleman S.W. 1991. Effects of acid detergent fiber intake on early postpartum milk production and chewing activities goats fed alfalfa hay. *Small Ruminant Research*. 6: 63-71
- Sanz Sampelayo M.R., Amigo L., Ares J.L., Sanz B., Boza J. 1998a. The use of diets with different protein sources in lactating goats: composition of milk and its suitability for cheese production. *Small Ruminant Research*. 31:37-43.
- Sanz Sampelayo M.R., Fernández J.R., De la Torre G., Ramos E., Carmona F.D., Boza J. 2003. Calidad de la leche de los pequeños rumiantes. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*. 16: 155-166.
- Sanz Sampelayo M.R., Martín Alonso J.J, Morón D., Boza J. 2000. Production of healthier goat milk. Use of a concentrate supplemented with a "protected" fat rich in PUFA. *Journal of Physiology and Biochemistry*. 3: 231-236.
- Sanz Sampelayo M.R., Martín Alonso J.J, Pérez L., Gil Extremera F., Boza J. 2004. Dietary supplements for lactating goats by polyunsaturated fatty acid-rich protected fat. Effects after supplement withdrawal. *Journal of Dairy Science*. 87: 1796-1802.
- Sanz Sampelayo M.R., Pérez L., Gil Extremera F., Boza J.J., Boza J. 1999. Use of different dietary protein sources for lactating goats: milk production and composition as functions of protein degradability and amino acid composition. *Journal of Dairy Science*. 82: 555-565.
- Sanz Sampelayo M.R., Pérez L., Martín Alonso J.J., Amigo L., Boza J. 2002. Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance lactating Granadina goats. Part II. Milk production and composition. *Small Ruminant Research*. 43:141-148.
- Sanz Sampelayo M.R., Pérez L., Boza J., Amigo L. 1998b. Forage of different physical forms in the diets of lactating granadina goats: nutrient digestibility and milk production and composition. *Journal of Dairy Science*. 81: 492-498.
- SAS. 1989. SAS/STAT® User's Guide Int. (Version 6,4th Edn.) Statistical Analysis Systems Institute Inc., Cary, NC (Estados Unidos).
- Schingoethe D. 1996a. Balancing the amino acid needs of dairy cow. *Animal Feed Science and Technology*. 60:153-160.
- Schingoethe D. 1996b. Dietary influence on protein level in milk and milk yield in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 60:181-190.
- Schmidely P., Lloret-Pujol M., Bas P., Rouzeau A., Sauvant D. 1999. Influence of feed intake and source of dietary carbohydrate on milk yield and composition, nitrogen balance, and plasma constituents of lactating goats. *Journal of Dairy Science*. 82: 747-755.
- Selner D.R., Schultz L.H. 1980. Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating cows. *Journal of Dairy Science*. 63: 1235-1241.
- Shabi Z., Tagari H., Murphy M.R., Bruckental I., Mabjeesh S.J., Zamwel S., Celik K., Arieli A. 2000. Partitioning of amino acids flowing to the abomasum into feed, bacterial, protozoal, and endogenous fractions. *Journal of Dairy Science*. 83: 2326-2334.

- Sievwright C.A., Shipe W.F. 1986. Effect of storage conditions and chemical treatment on firmness in vitro protein digestibility, condensed tannins, phytic acid and divalent cations of cooked black beans (*Phaseolus vulgaris*). *Journal of Food Science*. 51: 982-987.
- Singh C.K., Robinson P.H., McNiven M.A. 1995. Evaluation of raw and roasted lupin seeds as protein supplements for lactating cows. *Animal Feed Science and Technology*. 52: 63-76.
- Sniffen C.J., Robinson P.H. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. *Journal of Animal Science*. 49: 1590-1601.
- Sniffen C.J., O'Connor J.D., Van Soest P.J., Fox D.G., Russell J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*. 70: 3562-3577.
- Solanas E., Castrillo C., Balcells J., Guada J.A. 2005. In situ ruminal degradability and intestinal digestion of raw and extruded legume seeds and soya bean meal protein. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 89: 166-171.
- Statgraphics. 2001. User manual: Statistical Graphics System by Statistical Graphics Corporation. Rock-Will, MD.
- Stark B.A. 1988. Improving the quality of goat milk. *Dairy Industries International*. 53: 23-25.
- Stern M., Bach A., Calsamiglia S. 1997. Alternative techniques for measuring digestion in ruminants. *Journal of Animal Science*. 75: 2256-2276.
- Stern M.D., Hoover W.H. 1979. Methods for determining and factors affecting rumen microbial protein synthesis: A review. *Journal of Animal Science*. 49: 1590-1603.
- Stern M.D., Varga G.A., Clark J.H., Firkins J.L., Huber J.T., Palmquist D.L. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 77: 2762-2786.
- Sukhija P.S., Palmquist D.L., 1988. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 36: 1202-1206.
- Sutton J.D., Morant S.V. 1989. A review of the potential of nutrition to modify milk fat and protein. *Livestock Production Science*. 23: 219-237.
- Tabe L.M., Higgins C.M., McNabb W.C., Higgins T.J.V. 1993. Genetic engineering of grain and pasture legumes for improved nutritive value. *Genetika*. 90: 181-200.
- Taitz L.S., Armitage B.L. 1984. Goat's milk for infants and children. *British Medical Journal*. 288: 428-429.
- Tamminga S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *Journal of Animal Science*. 49: 1615-1630.
- Taylor S.L. 1986. Immunologic and allergic properties of cow's milk proteins in humans. *Journal of Food Protection*. 49: 239-250.
- Terrill T.H., Rowan A.M., Douglas G.B., Barry T.N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cerealgrains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58: 321-329.

- Tewatia B.S., Khatta V.K., Virk A.S., Gupta P.C. 1995. Effect of formaldehyde-treated faba beans (*Vicia faba* L.) on performance of lactating goats. *Small Ruminant Research*. 16: 107-111.
- Theodorou M.K., France J. 1993. Rumen microorganism and their interactions. En: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Forbes J.M y France J. Editores. CAB Internacional, Wallingford, Oxon, UK. p. 145-163.
- Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B. 1991. A new laboratory procedure for estimating kinetic parameters associated with the digestibility forages. En: *Proceedings of International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. USDA-ARS, Wisconsin.
- Thompson M.P., Tarassuk N.P., Jenness R., Lillevik H.A., Ashworth V.S., Rose D. 1965. Nomenclature of the protein of cow's milk. Second revision. *Journal of Dairy Science*. 48: 159-169.
- Tilley J.M.A., Terry R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society*. 18: 104-111.
- Trujillo A.J., Guamis B., Carretero C. 1997. Las proteínas mayoritarias de la leche de cabra. *Alimentaria*. 19-28.
- Van der Horst R.L. 1976. Foods of infants allergic properties of cow's milk. *South African Medical Journal*. 5: 927-928.
- Van der Poel A.F.B., Gravendeel S., Boer H. 1991. Effect of different processing methods on tannin content and in vitro protein digestibility of faba bean (*Vicia faba* L.). *Animal Feed Science and Technology*. 33: 49-58.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1995. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen *in vitro*: inhibition by antimicrobials. *Journal of Dairy Science*. 78: 2797-2806.
- Van Nevel C.J., Demeyer D.I. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development*. 36: 53-63.
- Van Soest P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Cornell University press. Ithaca (New York). p. 261.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.
- Van Straalen W.M., Tamminga S. 1990. Protein degradation in ruminants diets. En: *Feed Evaluation*. Wiseman J., Cole D.J.A. editores. Butterworth, Londres. Pp. 55-72.
- Varela G., Boza J., López Grande F. 1960. Valores leche y grasa de la veza y del salvado, en relación con las habas en cabras de raza granadina. *Colegios Veterinarios de España*. 7: 9-15.
- Varela G., Ferrer J., Boza J. 1961. Experiencias de digestibilidad en cabras de raza Granadina. *Zootecnia*. 10: 3-10.
- Vassal L., Delacroix-Buchet A., Bouillon J. 1994. Influence des variants AA, EE y FF de la caséine  $\alpha_{s1}$  caprine sur le redement fromager et les caractéristiques sensorielles de fromages traditionnels : premières observations. *Lait*. 74 : 89-103.

- Walhain P., Foucart M., Théwis A. 1992. Influence of extrusion on ruminal and intestinal disappearance of pea (*Pisum sativum*) protein and starch. *Animal Feed Science and Technology*. 38: 43-55.
- Walker V.B. 1965. Therapeutic uses of goat's milk in modern medicine. *Br. Goat Society's Yearbook*. 24-26. pp: 23-26.
- Wallace R.J. 1991. Ruminal proteolysis and its control. En: *Rumen microbial metabolism and ruminal digestion*. Joauny .P, INRA ediciones, París.
- Wallace R.J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. *Journal of Nutrition*. 126: 1326S-1335S
- Weisbjerg M.R., Bhargava P.K., Hvelplund, T., Madsen, J. 1990. Use of degradation profiles in feed evaluation. 679 beretning, statens Husdyrbrugsforsog.
- White C.L. Ashes J.R. 1999. A review of methods for assessing the protein value of grain fed to ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research*. 50: 855-869.
- Williams A.G., Withers S.E. 1991. Effect of ciliate protozoa on the activity of polysaccharide-degrading enzymes and fibre breakdown in the rumen ecosystem. *Applied Bacteriology*. 79:144-155.
- Wiseman J., Cole D.J.A. 1988. European legumes in diets for non-ruminants. En: *Recent Advances in Animal Nutrition*. Eds. W. Haresign and D.J.A. Cole. London. Butterworths. pp: 13-37.
- Woese C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Reviews*. 51: 221-271.
- Wright D.E. 1967. Metabolism of peptides by rumen microorganism. *Applied Microbiology*. 15: 148-151.
- Yáñez Ruiz. D. 2003. Utilización digestiva de dietas a base de orujo de dos fases y hoja de olivo en ovino y caprino. Efecto de factores no nutritivos. Tesis Doctoral.
- Yáñez Ruiz D.R., Molina Alcaide E., Weisbjerg M.R., Hvelplund T. 2004. Estimation of protein availability in ruminant feeds: a comparison of different methodologies. *Options Mediterranees*. 59: 127-132.
- Yáñez Ruiz D.R., Moumen A., Martín García A.I., Molina Alcalde E. 2003. Does type of diet fed to animals affect in sacco degradability of feedstuffs?. *First Joint Seminar of the FAO-CIHEAM Sheep and Goat Nutrition and Mountain and Mediterranean Pasture Sub-Networks*. Granada.
- Yu P., Goelema J.O., Leury B.J., Tamminga S., Egan A.R. 2002. An analysis of the nutritive value of heat processed legume seeds for animal production using the DVE/OEB model: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 99: 141-176.
- Yu P., Goelema J.O., Tamminga S., 2000. Determination of optimal conditions of pressure toasting on horse beans for dairy feed industry, by the DVE/OEB model. *Animal Feed Science and Technology*. 86: 165-176.
- Zeng S.S., Soryal K., Fekadu B., Bah B., Popham T. 2006. Predictive formulae for goat cheese yield based on milk composition. *Small Ruminant Research*. En prensa.

