



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS**

**EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MALATO Y DE LA  
FUENTE DE ALMIDÓN SOBRE EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO  
DE CORDEROS DE CEBO**

**TESIS DOCTORAL**

**Mário António Teófilo Mungói**

**Bellaterra (Barcelona), Julio de 2007**

**EFFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON MALATO Y DE LA FUENTE DE  
ALMIDÓN SOBRE EL RENDIMIENTO PRODUCTIVO DE CORDEROS DE CEBO**

Tesis Doctoral por:  
Mário António Teófilo Mungói

Bajo la dirección de:  
Dr. Ramon Casals i Costa  
Dr. Cristobal Flores Pérez

Para acceder al grado de Doctor en el Programa de Producción Animal de la  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS

Bellaterra, Julio de 2007

DEPARTAMENT DE CIÈNCIA ANIMAL I DELS ALIMENTS  
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

**RAMON CASALS I COSTA**, Profesor Titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, y **CRISTOBAL FLORES PÉREZ**, doctor veterinario e investigador de dicho Departamento

CERTIFICAN QUE:

La memoria titulada "**Efectos de la suplementación con malato y de la fuente de almidón sobre el rendimiento productivo de corderos de cebo**" presentada por Mário António Teófilo Mungói, se realizó bajo nuestra dirección y, considerando que cumple con las exigidas para optar al grado de Doctor en el del programa de doctorado de Producción Animal que otorga la Universitat Autònoma de Barcelona, autorizan su disertación pública para que sea juzgada por la Comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos que correspondan, firman el presente certificado en Bellaterra, a 8 de Junio de 2007.

Dr. Ramon Casals i Costa

Dr. Cristobal Flores Pérez

## Dedicatória

---

À memória de:

António Teófilo Mungói

e

Teresa de Jesús Mungói

pai e irmã inesquecíveis  
a quem o senhor antecipara as glórias celestiais

## Agradecimentos

---

Queria deixar expressos os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao meu orientador, Prof. Doutor Ramon Casals i Costa, pela disponibilidade e ajuda na elaboração desta tese, por ser um interlocutor paciente, generoso e pela confiança e amizade demonstrada.

Ao Doutor Cristobal Flores, pelos seus comentários ao manuscrito, um grande obrigado.

Ao Professor Doutor Geraldo Caja, pela aceitação de trabalhar no seu tema de pesquisa e estímulo especialmente na última fase do programa.

Aos Professores a quem pontualmente se recorreu, um especial obrigado.

A todo pessoal da Granja experimental, do laboratório de Produção Animal e da Unidad de Histología i Anatomia Patológica pelo excelente ambiente de trabalho que me proporcionaram.

Aos companheiros do gabinete (VO-308) e do Departamento: Doutores Cardozo, Eliel, Salama, Amine, Montserrat, y aos meus colegas Luciano “cérebro”, Nacho, Vanesa, Cristina, Miquel, Sergi, Juan Carlos, aos estudantes Pauloba e Dercio Taela pelo apoio que proporcionaram.

Agradeço à Universidade Eduardo Mondlane (Maputo) - Departamento de bolsas, Higher Education Project (HEP1), pelo apoio que nunca faltou.

À minha família, por todo apoio, carinho e amor especialmente, aos filhos, por suportar pacientemente um pai pouco disponível, este trabalho é em parte para vós.

À Eduarda por tudo.

Muchas gracias a todos

Mário António Teófilo Mungói  
Barcelona, Julho 2007.

<b>Abreviaturas</b>	i
<b>Resumen</b>	iii
<b>Abstract</b>	vii
<b>CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPITULO 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	5
<b>2.1. Carbohidratos</b>	7
<b>2.1.1. Clasificación de los carbohidratos</b>	7
2.1.1.1. Carbohidratos estructurales	8
2.1.1.1.1. Celulosa	8
2.1.1.1.2. Hemicelulosa	9
2.1.1.1.3. Pectina	9
2.1.1.1.4. Lignina	10
2.1.1.2. Carbohidratos no estructurales	10
2.1.1.2.1. Azúcares y fructanos	10
2.1.1.2.2. Almidón	11
<b>2.1.2. Propiedades físicas y químicas del almidón</b>	11
<b>2.1.3. Fuentes de almidones utilizadas en el cebo de rumiantes</b>	12
2.1.3.1. Cereales	13
2.1.3.2. Mandioca	15
<b>2.1.4. Digestión y fermentación ruminal de los carbohidratos</b>	16
<b>2.2. Acidosis ruminal</b>	24
<b>2.3. Alternativas para manipular la fermentación ruminal</b>	29
2.3.1. Aditivos microbianos	32
2.3.2. Extractos de plantas	34
2.3.3. Inmunización	34
2.3.4. Ácidos orgánicos	35
2.3.4.1. Efectos de los ácidos orgánicos (malato)	37
2.3.4.1.1. Estudios <i>in vitro</i>	38
2.3.4.1.2. Estudios <i>in vivo</i>	41
<b>2.4. Referencias bibliograficas.</b>	47
<b>CAPITULO 3. OBJETIVOS</b>	63
<b>3.1. Objetivo general</b>	65
<b>3.2. Objetivos específicos</b>	65
<b>CAPITULO 4.</b>	
<b>Effects of malate on growth performance, ruminal traits, digestibility and nutrient balance in lambs fed wheat or manioc-barley</b>	67
<b>Abstract</b>	69
<b>1. Introduction</b>	70
<b>2. Material and methods</b>	72
<b>2.1. Experiment 1. Growth performance and ruminal traits of growing lambs</b>	72
2.1.1. Animals, experimental diets, and management	72
2.1.2. Measurements, calculations and analysis	73
2.1.3. Statistical analysis	76

<b>2.2. Experiment 2. Digestibility and nutrient balance of growing lambs</b>	77
2.2.1. Animals, treatments, and experimental procedures	77
2.2.2. Measurements, sample collection and analysis	78
2.2.3. Statistical analysis	79
<b>3. Results</b>	80
<b>3.1. Experiment 1</b>	80
3.1.1. Chemical composition of feed	80
3.1.2. Nutrient intake	81
3.1.3. Growth performance	81
3.1.4. Ruminal pH, color and histomorfometric of ruminal epithelium	81
<b>3.2. Experiment 2</b>	82
3.2.1. Nutrient intakes and performance	82
3.2.2. Apparent total tract digestibility	83
3.2.3. Faeces pH and consistency	83
3.2.4. Energy balance	83
3.2.5. Nitrogen balance	83
<b>4. Discussion</b>	84
4.1. Chemical composition of feed	84
<b>4.2. Experiment 1</b>	85
4.2.1. Nutrients intake	85
4.2.2. Growth performance	85
4.2.3. Histomorfometric of ruminal mucosa	86
<b>4.3. Experiment 2</b>	87
4.3.1. Intake	87
4.3.2. Performance, faeces pH and consistency	87
4.3.3. Digestibility of the nutrients	88
4.3.4. Energy and nitrogen balance	89
<b>5. Conclusions</b>	90
<b>6. References</b>	90
<b>CAPITULO 5</b>	
<b>Effect of increasing malate level in high-concentrate diets on performance, ruminal pH and fermentation profile in growing lambs</b>	101
<b>Abstract</b>	103
<b>1. Introduction</b>	104
<b>2. Material and methods</b>	105
<b>2.1. Experiment 1. Effect of different levels of malate on growth and carcass performances</b>	105
2.1.1. Animals, experimental diets, and management	105
2.1.2. Measurements, calculations and analysis	106
<b>2.2. Experiment 2. Effect of different levels of malate on growth, ruminal pH, ammonia N and volatile fatty acid of fattening lambs</b>	107
2.2.1. Animals, experimental diets, and management	107
2.2.2. Measurements, calculations and analysis	107
<b>2.3. Statistical analysis</b>	108
<b>3. Results</b>	110
<b>3.1. Experiment 1</b>	110
3.1.1. Effect on intake	110

3.1.2. Effect on performance	111
<b>3.2. Experiment 2</b>	111
3.2.1. Effect on intake	111
3.2.2. Effect on performance	111
3.2.3. Effects on ruminal pH, ammonia N and volatile fatty acid	111
<b>4. Discussion</b>	112
<b>4.1. Experiment 1</b>	112
4.1.1. Intake	112
4.1.2. Lambs performance	113
<b>4.2. Experiment 2</b>	114
4.2.1. Intake and performance	114
4.2.2. Ruminal pH, concentrations of ammonia N and volatile fatty acid – Ruminal fermentation	115
<b>5. Conclusions</b>	117
<b>6. References</b>	117
<b>CAPITULO 6. DISCUSIÓN GENERAL</b>	127
<b>CAPITULO 7. CONCLUSIONES</b>	135

### ÍNDICE DE TABLAS

#### CAPITULO 2

<b>Tabla 1.</b> Valor nutritivo, degradabilidad teórica y límite máximo de incorporación de diferentes fuentes de almidón utilizadas en el cebo de rumiantes.	13
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de las especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan.	19
<b>Tabla 3.</b> Formación de ácidos grasos volátiles a partir de carbohidratos.	20
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de los protozoos ruminales y sus sustratos de fermentación preferentes.	21
<b>Tabla 5.</b> Caracterización química de los principales ácidos orgánicos utilizados en alimentación animal.	36
<b>Tabla 6.</b> Efectos de la suplementación con malato en estudios <i>in vitro</i> .	40
<b>Tabla 7.</b> Efectos de la suplementación con malato en vacas y cabras lecheras.	42
<b>Tabla 8.</b> Efectos de la suplementación con malato en bovinos.	45
<b>Tabla 9.</b> Efectos de la suplementación con malato en ovinos.	46

#### CAPITULO 4

<b>Table 1.</b> Ingredients and chemical composition of experimental concentrates fed to lambs (Exp. 1 and 2).	96
<b>Table 2.</b> Effects of malate (M) and source of starch (S) on concentrate nutrients intake, of fattening lambs (Exp. 1).	97
<b>Table 3.</b> Effects of malate (M) and source of starch (S) on performances, weight and carcass yield of fattening lambs (Exp. 1).	97
<b>Table 4.</b> Effects of malate (M) and source of starch (S) on histomorfometric characteristics of ruminal papillae, ruminal pH and color ruminal mucosa of fattening lambs.	98
<b>Table 5.</b> Effects of malate (M) and source of starch (S) on voluntary intake and water consumption of fattening lambs (Exp. 2).	98



<b>Table 6.</b> Effects of malate (M) and source of starch (S) on performance, faeces pH, faecal consistency and apparent total tract digestibility coefficients of diets of fattening lambs.	99
<b>Table 7.</b> Effects of malate (M) and source of starch (S) on energy balance of fattening lambs.	99
<b>Table 8.</b> Effects of malate and source of starch (S) on nitrogen (N) balance of fattening lambs.	100

## CAPITULO 5

<b>Table 1.</b> Ingredients and chemical composition of experimental concentrates fed to lambs, containing increasing levels of malate.	122
<b>Table 2.</b> Effects of including different levels of malate in the concentrate of fattening lambs on voluntary intake (Exp.1).	123
<b>Table 3.</b> Effects of including different levels of malate in the concentrate malate on performance of fattening lambs (Exp.1).	124
<b>Table 4.</b> Effects of including different levels of malate in the concentrate of growing lambs on voluntary intake (Exp.2).	125
<b>Table 5.</b> Effect of including different levels of malate in the concentrate on ruminal pH, concentrations of ammonia N (NH <sub>3</sub> -N) and total volatile fatty acid (VFA), and individual VFA proportions in lambs.	126

## CAPITULO 6

<b>Tabla 1.</b> Concentración de malato (% de la MS) en los concentrados experimentales según los ingredientes utilizados y de la dosis de Rumalato utilizada en el concentrado.	129
--	-----

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPITULO 2

<b>Figura 1.</b> División de los carbohidratos de las plantas.	8
<b>Figura 2.</b> Raíces, ramas y follaje de mandioca.	15
<b>Figura 3.</b> Aparato digestivo de un rumiante adulto mostrando los diferentes compartimientos.	17
<b>Figura 4.</b> Esquema de la acidosis ruminal.	26
<b>Figura 5.</b> Rutas de acción de los aditivos en el metabolismo energético	32
<b>Figura 6.</b> Esquema de la formación y metabolismo de los ácidos grasos volátiles en el rumen.	38

### CAPITULO 6

<b>Figura 1.</b> Efecto de la dosis de malato sobre la ingestión de pienso y de paja en corderos de cebo (Exp. 2.1).	130
<b>Figura 2.</b> Evolución del índice de conversión del concentrado en función de la concentración de malato en el mismo.	131

A: acético  
ADF : acid detergent fiber  
ADG : average daily gain  
AGV : ácidos grasos volátiles  
ATP : adenosina trifosfato  
BW : body weight  
CEE : Comunidad Económica Europea  
°C : grados centígrados  
CH<sub>4</sub>: metano  
CNE : carbohidratos no estructurales  
CP : crude protein  
CV : consumo voluntario  
d : día  
DM : dry matter  
DMI : dry matter intake  
EB : energía bruta  
Ed : edición, editor (s)  
EM : energía metabolizable  
et al : et alia  
FAD : fibra ácido detergente  
FCR : feed conversion ratio  
FND : fibra neutro detergente  
g : gramo o gramos  
GE : gross energy  
GLM : general linear model  
GMD : ganancia media diaria  
IC : índice de conversión  
IDE : identificación electrónica  
i.e. : es decir  
IMS : ingestión de materia seca  
Kd : ritmo de degradación  
kg : kilogramo o kilogramos  
Kp : ritmo de paso  
Mcal : megacalorías  
mM : milimol  
MNB : manioc and barley  
MNB+M : manioc and barley with malate

MNC+M : mandioca y cebada con malato  
mg : milígramo o milígramos  
MS : materia seca  
N : nitrógeno  
NADPH<sub>2</sub> : nicotinamida adenosin fosfato hidrogenado  
NDF : neutral detergent fibre  
NS : no significativo  
OM : organic matter  
P: propionico  
PB : proteína bruta  
pH : potencial de hidrógeno  
Pka : constante de equilibrio  
PO : presión osmótica  
PV : peso vivo  
Sem. : semana  
S1GCE : Servei de Granges i Camps Experimentales  
T : trigo  
Tm: tonelada métrica  
T+M : trigo con malato  
UAB : Universitat Autònoma de Barcelona  
UE : Unión Europea  
v. : versión  
Vs. : versus  
W : wheat  
wk : week  
W+M : wheat with malate  
× : multiplicado por o interacción

## RESUMEN

Para evaluar el uso de malato como aditivo en el pienso de corderos de engorde, se realizaron dos trabajos experimentales. En el primero de ellos se llevaron a cabo dos experimentos (1.1 y 1.2) a fin de evaluar los efectos del malato (Rumalato<sup>®</sup>, 160 g/kg malato sódico y 840 g/kg malato cálcico) y de la fuente de almidón en corderos en cebo intensivo. En el primer experimento (1.1) se utilizaron 73 corderos de raza Ripollesa (7 sem.) distribuidos en 8 lotes homogéneos (2 por tratamiento) para evaluar los efectos sobre el crecimiento y las características ruminales al sacrificio. Los corderos fueron alimentados *ad libitum* con paja de cebada y concentrado granulado, el cual varió según la adición o no de malato (0 o 2 g/kg) y la fuente principal de almidón (trigo o una mezcla de mandioca y cebada). Los tratamientos fueron: **T** (trigo sin malato), **T+M** (trigo con malato), **MC** (mandioca y cebada sin malato) y **MC+M** (mandioca y cebada con malato). El malato aumentó ( $P < 0,05$ ) la ingestión de materia seca (MS) y de la mayoría de nutrientes provenientes del concentrado, así como la ganancia media diaria (GMD) de peso, pero no afectó ( $P > 0,05$ ) el índice de conversión (IC), la edad al sacrificio, el peso y el rendimiento canal, el pH ruminal al sacrificio, ni las características histomorfológicas de la mucosa ruminal. Los corderos que recibieron trigo tuvieron mayores valores de ingestión de concentrado, materia orgánica (MO), proteína bruta (PB) energía bruta (EB) y malato ( $P < 0,04$ ), mayor densidad de papilas ruminales ( $P < 0,001$ ), mayor queratinización ( $P < 0,02$ ) y la mucosa ruminal menos oscura ( $P < 0,001$ ) que los que tomaron mandioca y cebada. En cambio se observó una mayor ( $P < 0,03$ ) anchura en las papilas ruminales en los corderos que consumieron mandioca y cebada. Se observaron interacciones malato  $\times$  almidón ( $P < 0,05$ ) en diversos parámetros como: ingestión de concentrado, MO, PB, GMD, edad al sacrificio, superficie de absorción ruminal, anchura de las papilas y grosor de pared ruminal. En general, el malato tuvo más efecto con el trigo que con la mandioca y cebada. En el segundo experimento (1.2) se utilizaron 8 corderos machos de raza Manchega (13,2 kg PV), alojados en cajas de digestibilidad, en un diseño en doble cuadrado Latino  $4 \times 4$  para evaluar los efectos del malato y de la fuente de almidón (mismos tratamientos experimentales que en el caso anterior) sobre la digestibilidad de nutrientes, el pH y la consistencia de las heces, y los balances de energía y nitrógeno. El malato no

afectó la ingestión total (incluida paja) de MS, la GMD, ni el IC ( $P > 0,05$ ), aumentó ( $P < 0,01$ ) la ingestión total de fibra neutro detergente (FND) y redujo ( $P < 0,02$ ) las digestibilidades de la MS, MO y fibra ácido detergente (FAD), pero sin afectar los balances de energía y de nitrógeno. Los corderos que consumieron pienso a base de trigo tuvieron mayor ingestión de PB y de malato ( $P < 0,01$ ). Sin embargo, los alimentados con concentrados a base de mandioca y cebada dieron mayores valores de digestibilidad de MS y MO ( $P < 0,03$ ), y de pH y consistencia de las heces ( $P < 0,02$ ), excretando menos N urinario y total ( $P < 0,02$ ). En consecuencia tuvieron menor pérdida de energía en orina ( $P < 0,04$ ) y tendencia a tener mayores valores de ingestión de energía digestible y metabolizable ( $P < 0,09$ ) que los que consumieron trigo. Se observaron interacciones malato  $\times$  almidón ( $P < 0,05$ ) en la ingestiones de concentrado, MO, almidón y malato, así como en el N ingerido, fecal, digestible y retenido. En conclusión, los resultados de este primer estudio indican que el malato (2 g/kg concentrado) aumentó la GMD, especialmente en dietas a base de trigo, pero no mejoró el IC, la superficie de absorción ruminal, ni la digestibilidad y el balance de nutrientes.

En el segundo trabajo experimental se realizaron también 2 experimentos (2.1) y 2.2) para evaluar los efectos de dosis crecientes (**0, 3, 6, y 9 g/kg concentrado**) de malato (Rumalato<sup>®</sup>, 850 g/kg de E 296 DL- ácido málico) en el concentrado de corderos en crecimiento. En el primer experimento (2.1) se usaron setenta y ocho corderos de cebo de razas Manchega y Lacaune a partir del destete (6 sem.) distribuidos en 8 lotes homogéneos (2 por tratamiento) para evaluar los efectos de la dosis de malato sobre los parámetros productivos. Los animales recibieron a voluntad, agua, paja de cebada y los concentrados experimentales. Al aumentar el nivel de malato se observó una disminución lineal ( $P < 0,04$ ) de la ingestión de concentrado y un aumento lineal ( $P < 0,02$ ) de la ingestión de paja, lo que dio lugar a una disminución también lineal ( $P < 0,03$ ) de la ingestión total de MS y del IC. La GMD (301 g/d), la edad al sacrificio (31 d), el peso (11,5 kg) y el rendimiento en canal caliente (49,7 %) no fueron afectados por los tratamientos. En el segundo experimento (2.2) se utilizaron treinta corderas de reposición de las razas Manchega y Lacaune (10 sem.) distribuidas en 4 grupos homogéneos, recibiendo los mismos tratamientos que en el anterior, para evaluar el pH, la concentración de N amoniacal (NH<sub>3</sub>-N) y la de ácidos grasos volátiles (AGV) en el rumen, además

de los resultados productivos. Al aumentar el nivel de malato, se observó una disminución ( $P < 0,05$ ; cúbica) de la ingestión de MS de concentrado y una tendencia al aumento ( $P < 0,10$ ; cúbica) de la ingestión de MS de paja, lo que dio lugar a una tendencia a la disminución ( $P < 0,08$ ; cúbica) de la ingestión total de MS y a una reducción del IC ( $P < 0,05$ , cúbica), sin que se viera afectada la GMD. Al aumentar la dosis de malato, aumentaron el pH ruminal ( $P < 0,01$ ; cúbica), la concentración de AGV totales ( $P < 0,02$ ; cuadrática) y la proporción molar de butirato ( $P < 0,01$ ; lineal), disminuyendo la de acetato ( $P < 0,02$ ; lineal). Las concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$  y AGV ramificados, las proporciones molares de propionato, isobutirato e isovalerato, y la relación acético:propionato no se vieron afectadas. En conclusión, en este segundo estudio la adición de malato ( $\geq 3$  g/kg concentrado) aumentó el consumo de paja, pero redujo el de concentrado y el IC, sin afectar el crecimiento de los corderos. Este resultado contrasta con el obtenido en el primer estudio, en que el malato, bajo otra forma química y con otros ingredientes, mejoró la GMD, pero no el IC. Por tanto, se puede decir que, de forma general, la suplementación con malato puede tener efectos positivos sobre alguno de los parámetros productivos, pero dichos efectos son variables y difíciles de predecir, en función de las circunstancias concretas de cada caso.

**ABSTRACT**

Two studies were conducted to test the use of malate as a feed additive in fattening lambs. In the first study, two experiments (1.1 and 1.2) were carried out to evaluate the main effects of malate (Rumalato<sup>®</sup>, 160 g/kg disodium malate and 840 g/kg calcium malate) and starch source in the concentrate of fattening lambs on growth performance, ruminal traits, digestibility and nutrient balance. In the first experiment (1.1), 73 Ripollesa breed lambs (7 wk of age) were fed *ad libitum* with pelleted concentrates and barley straw, and used in a 2 × 2 factorial arrangement to evaluate effects on growth performance and ruminal traits at slaughter. Four types of concentrate were prepared according to malate addition (0 vs. 2 g/kg) and starch source (wheat vs. a mixture of manioc and barley). Treatments were: **W** (wheat without malate), **W+M** (wheat with malate), **MNB** (manioc-barley without malate) and **MNB+M** (manioc-barley with malate). Feeding malate increased ( $P < 0.05$ ) concentrate intake and average daily gain (ADG) but did not affect feed conversion ratio (FCR), days at slaughter, weight and carcass yield, ruminal pH, and histomorphometric characteristics of ruminal papillae. Lambs fed wheat showed higher ( $P < 0.05$ ) intakes of concentrate dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), gross energy (GE) and malate, as well as ruminal papillae denseness ( $P < 0.001$ ) and keratin ( $P < 0.02$ ) than lambs fed manioc and barley, while a higher rumen papillae width (PW) was observed in lambs that consumed manioc-barley ( $P < 0.02$ ) than in lambs fed wheat. Interactions ( $P < 0.05$ ) between malate and source of starch were found for intakes of concentrate DM, OM and CP, days at slaughter for 23 kg, ADG, ruminal papillae surface area ratio, PW and rumen wall thickness. In general, the higher effects of feeding malate were observed in wheat diets. The appearance of the rumen epithelium colour was grey in wheat diets and darker for those of manioc-barley ( $P < 0.001$ ). In the second experiment (1.2), 8 individualized male Manchega lambs, under the same treatments than in exp. 1, were used in a double 4 × 4 Latin square design to evaluate nutrient digestibility and energy and nitrogen (N) balance. Malate did not affect ( $P > 0.05$ ) total DMI, although increased intakes of acid detergent fiber and malate ( $P < 0.01$ ). Malate addition decreased digestibility of DM, OM and acid detergent fiber ( $P < 0.02$ ). Compared to lambs fed manioc and barley, lambs fed

wheat had higher ( $P < 0.01$ ) intakes of CP and malate, and tended to have higher ( $P < 0.07$ ) intakes of barley straw, lower ( $P < 0.03$ ) faecal pH and consistency, and lower ( $P < 0.03$ ) digestibility of DM and OM, and tendency to lower ( $P < 0.09$ ) digestibility of NDF and GE. Malate had no effect on energy and N balances. Lambs fed manioc-barley excreted less ( $P < 0.02$ ) urinary and total N, and retained higher ( $P < 0.05$ ) percentage of N than those fed manioc and barley. As a consequence they had lower losses of urinary energy ( $P < 0.04$ ) and tended to have greater digestible and metabolizable energy ( $P < 0.09$ ). Interactions ( $P < 0.05$ ) between malate and source of starch in intakes (concentrate and total DM, OM, CP, starch, and malate), digested and retained N were observed. These results indicate that malate (2 g/kg in concentrate) was useful for increasing ADG in wheat based diets, but did not provide additional benefits on feed efficiency, ruminal traits, digestibility and nutrient balance in intensively fattened lambs.

In the second study, two experiments (2.1 and 2.2) were designed to evaluate the effects of increasing levels (0, 3, 6 and 9 g/kg concentrate) of malate (Rumalato®, 850 g/kg of E 296 DL-Malic acid and 15 g/kg of calcium carbonate and sodium bicarbonate as excipient) in growing lambs. Lambs were fed *ad libitum* with barley straw and pelleted concentrates. In the first experiment (1.2), a total of seventy-eight Manchega and Lacaune weaned lambs (6 wk) were used in a completely randomized block design to evaluate growth performance. There was a linear decrease ( $P < 0.04$ ) in concentrate intake and increase ( $P < 0.02$ ) in straw intake with increasing malate level, resulting in a linear decrease of total DM intake ( $P < 0.03$ ). Days at slaughtering (31 d) ADG (301 g), carcass weight (11.50 kg) and carcass yield (49.74%) were not affected by treatments, but feed conversion ratio (FCR) decreased ( $P < 0.02$ ) linearly with malate increased level. In the second experiment (2.2), a total of thirty female Manchega and Lacaune lambs (10 wk) were fed the same diets under the same design used in the first experiment to evaluate ruminal pH, ruminal ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) concentration, and total and individual volatile fatty acid (VFA) concentration. There was a cubic decrease in concentrate intake ( $P < 0.05$ ) and a tendency to cubic increase in straw intake ( $P < 0.10$ ) with increasing malate level, resulting in a cubic decrease in total DM intake ( $P < 0.08$ ) and FCR ( $P < 0.05$ ), without negative effects on ADG. Ruminal pH and total VFA showed a cubic and a quadratic increase ( $P < 0.01$ ),



respectively, with increasing malate level. Butyrate molar proportion increased ( $P < 0.01$ ) linearly with malate increased level, while proportions of acetate and valerate decreased ( $P < 0.02$ ) linearly and quadratically, respectively. The  $\text{NH}_3\text{-N}$  and branch-chained VFA concentration, propionate, isobutirate and isovalerate proportions and acetate to propionate ratio were not modified by malate level. As a conclusion of this second study, including increasing levels of malate ( $\geq 3$  g/kg concentrate) in intensive fattening diets may result in lower consumption of concentrate, higher straw intake and reduced FCR. This result doesn't agree with the observed in the first study, under other experimental conditions, where feeding malate increased ADG but had no effect on FCR. Therefore, as a general conclusion, is possible to say that malate may have some positive effect on productive parameters, but the final response is difficult to predict.

CAPÍTULO 1:  
**Introducción**

La rápida evolución de los sistemas de producción animal, impulsada por cambios socio-económicos y de mercado, y la necesidad de integrar los aspectos medio ambientales en su gestión, está haciendo variar las bases tradicionales de la producción. En el proceso de cambio, la mejora de los sistemas de producción animal debe permitir una disminución de los costes de producción y la obtención de beneficios que garanticen la competitividad y viabilidad de las explotaciones.

Uno de los aspectos limitantes de la rentabilidad de la empresa ovina lo constituyen los costes de alimentación y, en particular, los relativos al suministro de energía, que debe ser adecuado en cantidad y en calidad, y a un coste razonable.

En condiciones de cebo intensivo, los rumiantes consumen fundamentalmente piensos ricos en carbohidratos rápidamente fermentables. El resultado de un elevado consumo de este tipo de raciones es un incremento en la producción de lactato y una posible disminución del pH ruminal, generando problemas digestivos (disminución de la actividad celulolítica, de la digestibilidad, y de la relación acetato:propionato), productivos (trastornos de la ingestión y de la producción) y patológicos (laminitis, rumenitis y los abscesos hepáticos). El tipo de forraje, así como el tipo de almidón, afectan la degradación ruminal de este, siendo mayor el riesgo de acidosis cuando la tasa de degradación es alta (Monteils *et al.*, 2002).

Las fuentes del almidón más comúnmente utilizadas en la alimentación animal son los cereales grano. Si tenemos en cuenta que de un 25 a un 35% de la materia seca (MS) de la ración esta compuesta por almidón, es evidente que los cereales representan una porción significativa en los costes de producción, y que la digestión ruminal del almidón determina, en gran parte, el comportamiento productivo de los rumiantes alimentados con dietas ricas en concentrado (Britton y Stock, 1986).

Debido a su alto contenido en almidón (60–72%), la harina de mandioca es también una buena fuente de energía y una alternativa a los cereales, con un gran potencial de uso en la fabricación de alimentos concentrados. Diversos estudios muestran que, con adecuadas relaciones de precios, y con un complemento proteico, puede llegar a sustituir parcialmente a los cereales en la formulación de raciones para rumiantes.

La mayor parte del almidón de la mandioca (70%) se encuentra en forma de amilopectina, lo que le confiere una elevada digestibilidad. Sin embargo, la

ausencia de matriz proteica facilita su rápida degradación en el rumen (Holzer et al., 1997) y puede favorecer la aparición de acidosis ruminal.

Tradicionalmente, para controlar la fermentación ruminal y reducir los riesgos de acidosis se han utilizado, entre otros aditivos, los antibióticos ionóforos. Sin embargo, a raíz de la prohibición del uso indiscriminado de antibióticos en alimentación animal, surge la necesidad de desarrollar y utilizar aditivos no antibióticos que permitan optimizar la utilización de nutrientes, y mejorar los rendimientos y la competitividad del sector. En el caso de los rumiantes, se han investigado varios ácidos orgánicos, entre ellos el malato, como posibles alternativas a los antibióticos para intentar modificar la fermentación ruminal de forma favorable.

Estudios *in vitro* (Carro y Ranilla, 2003; Gómez *et al.*, 2005) han demostrado que la adición de malato estimula la fermentación ruminal aumentando la concentración total de ácidos grasos volátiles (AGV). El uso de los ácidos orgánicos como aditivos en el pienso ha mostrado tener efectos positivos en el crecimiento e índice de conversión de rumiantes en cebo, tanto en terneros (Streeter *et al.*, 1994; Martin, 1998) como en corderos (Caja *et al.*, 2000; Garín *et al.*, 2001; Flores, 2004). Sin embargo, las respuestas han sido inconsistentes en lo que se refiere a indicadores productivos, poniendo en evidencia la necesidad de profundizar los conocimientos relacionados con el mismo.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar el efecto de la adición de malato a pienso de corderos en cebo intensivo sobre la fermentación ruminal y los rendimientos productivos. Este objetivo incluiría la evaluación de la digestibilidad de la ración y la valoración de algunas características ruminales al sacrificio. Con ello se pretende ampliar los conocimientos sobre los efectos de los ácidos orgánicos en corderos alimentados con raciones ricas en concentrado.

CAPÍTULO 2:  
**Revisión bibliográfica**

## 2.1. CARBOHIDRATOS

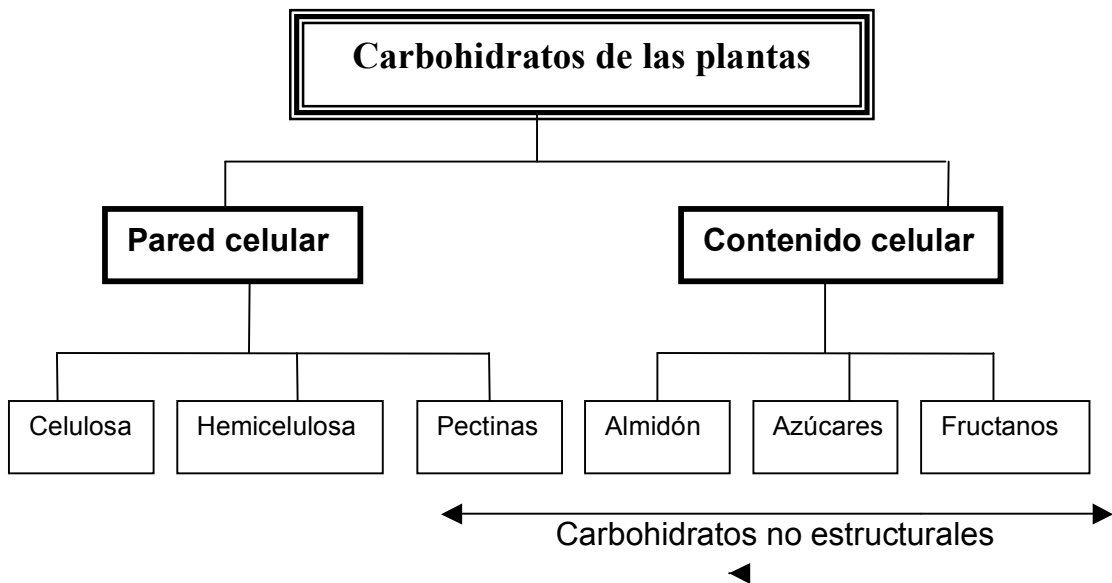
Los carbohidratos son la fuente primaria de energía para los seres vivos, aportan átomos de carbono para la síntesis de otros componentes celulares, constituyen la forma principal de almacenamiento de energía y son elementos estructurales de las células y los tejidos (Lenhinger, 1985). La modulación de su fermentación a nivel ruminal constituye uno de los puntos de interés de técnicos e investigadores especialistas en nutrición animal.

### 2.1.1. Clasificación de los carbohidratos

Existen tres tipos básicos de carbohidratos: *monosacáridos*, *oligosacáridos* y *polisacáridos*. Los **monosacáridos** o azúcares sencillos, están constituidos por una unidad aislada de polihidroxi-aldehído o cetona. El monosacárido más abundante es la glucosa, azúcar de 6 átomos de carbono, que constituye la molécula combustible más importante para la mayor parte de los organismos, y que desempeña también el papel de construcción de algunos de los polisacáridos más abundantes, tales como el almidón y la celulosa (Van Soest, 1982). Los **oligosacáridos** están constituidos por cadenas de 2 a 10 unidades de monosacáridos, unidos mediante enlaces glicosídicos. Entre ellos se encuentran los disacáridos y los trisacáridos, que poseen dos y tres unidades de monosacárido, respectivamente. Los **polisacáridos** están integrados por cadenas muy largas de unidades de monosacáridos, pudiendo ser lineales o ramificados. La mayor parte de los carbohidratos de la naturaleza aparecen en forma de polisacáridos de elevado peso molecular. Los polisacáridos, que también reciben el nombre de glicanos, difieren en la naturaleza de las unidades monosacarídicas recurrentes, en la longitud de sus cadenas y en el grado de ramificación. Según la función que desempeñen, suelen agruparse en carbohidratos estructurales, que integran la pared celular vegetal, y en carbohidratos de reserva o no estructurales (CNE), que se localizan en el contenido celular (Van Soest, 1994). Dentro de los primeros se incluyen aquellos que son selectivamente retenidos en una solución neutro detergente, definiéndose en este caso como Fibra Neutro Detergente (FND), como son: hemicelulosa, celulosa y la lignina. Esta última, sin ser un

carbohidrato, se encuentra íntimamente ligada a la pared celular y se incluye dentro de la fracción de FND. Los almidones, los azúcares, los fructanos y las pectinas (Figura 1), por su parte, se englobarían en el segundo grupo o CNE (de Blas et al., 1987; McDonald et al., 1993).

**Figura 1.** División de los carbohidratos de las plantas (Adaptado de Hall, 2007).



### 2.1.1.1. Carbohidratos estructurales

#### 2.1.1.1.1. Celulosa

Según Bach Knudsen (1997), la celulosa es el principal carbohidrato sintetizado por las plantas, es el elemento básico de la pared celular y esta presente en las cáscaras de leguminosas y oleaginosas (400-500 g/kg MS), en forrajes y tubérculos (100-300 g/kg MS), en las semillas de cereales (16-82 g/kg MS) y en la mandioca (27 g/kg MS). La celulosa está constituida principalmente por microfibrillas cristalinas, lineales y de alto peso molecular, formando polímeros de moléculas de D-Glucosa. La celulosa es degradada por una enzima compleja, la celulasa, la cual consta como mínimo de dos unidades importantes: C-1, que rompe los enlaces de hidrógeno, liberando cadenas de glucosa susceptibles a una posterior hidrólisis, y C-x, que hidroliza estas cadenas hasta celobiosa y glucosa.

### **2.1.1.1.2. Hemicelulosa**

Las hemicelulosas son, después de la celulosa, uno de los polímeros más abundantes sintetizados en la biosfera (Joseleau et al., 1992). Están presentes en forrajes y subproductos agro-industriales (100-250 g/kg MS), y en cereales y tubérculos (20-120 g/kg MS; Giger-Reverdin, 1995). Son un grupo heterogéneo de polisacáridos asociados con la celulosa y la lignina de las membranas celulares de las plantas, definiéndose por lo general como polisacáridos insolubles en agua, que pueden ser extraídos con álcalis diluidos y que, tras la hidrólisis ácida, dan origen a azúcares y, algunas veces, a azúcares y ácidos del azúcar (Van Soest, 1982). Las hemicelulosas contienen dos tipos de polisacáridos: 1) polisacáridos de cadena corta (o celulosanas), que forman parte de la propia estructura de la celulosa y están orientadas en la estructura micelar, y 2) polisacáridos amorfos incrustados, que se asocian íntimamente con la lignina de la membrana celular.

### **2.1.1.1.3. Pectina**

Los carbohidratos incluidos en el grupo de las pectinas incluyen los poligalacturonanos (ramnogalacturonanos) y polisacáridos tales como los arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Hatfield, 1989; Chesson, 1994). Las pectinas pueden contener enlaces de ésteres con ácidos fenólicos, tales como el ácido ferúlico (Williamson et al., 1998). Están presentes en los vegetales, donde son el material aglutinador de las fibras de celulosa (Van Soest, 1994), y constituyen aproximadamente el 35% de la pared celular en dicotiledóneas, (Rodríguez-Palenzuela et al., 1998), como alfalfa (*Medicago sativa* L.). Son particularmente abundantes en tejidos blandos (piel de los cítricos) y en la pulpa de remolacha (McDonald et al., 2002). Desde el punto de vista fisiológico, las pectinas son hidratos de carbono estructurales. Sin embargo, no están unidos de forma covalente con la porción lignificada de la pared celular y son fermentados fácilmente en el rumen, por lo que desde el punto de vista de su fermentescibilidad ruminal se consideran como CNE (Nocek y Tamminga, 1991). Las pectinas tienen un elevado contenido energético, pero a diferencia de los almidones, el acetato es el principal producto de su fermentación (Van Soest,



1982). La actividad pectolítica, se ha demostrado en bacterias y protozoos, pero es muy baja en los hongos anaeróbicos. Los microorganismos que degradan la pectina son especialmente sensibles a descensos en el pH ruminal (Strobel y Russel, 1986).

#### **2.1.1.1.4. Lignina**

La lignina no es en realidad un carbohidrato, sino un compuesto fenólico de la pared celular (Lapierre, 1993), que limita la digestibilidad de componentes. Se trata de un polímero con estructura no definida (Ralph et al., 1996), y existe una gran heterogeneidad entre las ligninas de diferentes especies, órganos, tejidos y posiblemente de tipo de células (Lam et al., 1990). Las ligninas han sido clasificadas como lignina nuclear o central, y lignina no nuclear (Lapierre, 1993). Según Giger-Reverdin (1995) y Bach Knudsen (1997), está presente en los cereales grano (9-32 g/kg MS), en la mandioca (23 g/kg MS) y en los forrajes (50-120 g/kg MS). Los compuestos fenólicos de la pared celular han sido considerados como el principal factor que limita la disponibilidad de la misma para los animales (Jung y Ralph, 1990; Van Soest, 1994). La lignina ejerce una acción negativa sobre la digestibilidad de los componentes de la pared celular, protegiéndolos de la hidrólisis enzimática derivada de los procesos digestivos (Jung y Allen, 1995).

#### **2.1.1.2. Carbohidratos no estructurales**

##### **2.1.1.2.1. Azúcares y fructanos**

Los CNE se encuentran en el contenido celular vegetal, son altamente digestibles, variando principalmente el sitio de digestión en función de las características de los mismos, de la presentación y del tipo de alimento (concentrado, forraje fibroso y otros). Entre sus principales componentes están el almidón, los azúcares simples, los fructanos y los ácidos orgánicos.

Los azúcares solubles solamente son abundantes por periodos cortos de tiempo después de la ingestión de alimento y posteriormente actúan como metabolitos intermedios en la degradación de carbohidratos más complejos

(Hungate, 1966). Su degradación es inmediata por las poblaciones bacterianas que digieren carbohidratos más complejos. Los fructanos pueden ser degradados por los microorganismos y ser almacenados en forma de almidón microbiano para ser utilizados con posterioridad (Hall, 2007)

Los ácidos orgánicos, son productos de fermentación de los carbohidratos, y solo son importantes en los ensilados, aportando muy poca energía a los microorganismos ruminales.

#### **2.1.1.2.2. Almidón**

El almidón es el principal reservorio de polisacáridos en las plantas (Van Soest, 1994) y el constituyente más importante del endosperma de los cereales, variando su proporción según el tipo de grano y otros factores intrínsecos de la planta. Según FEDNA (2003) el almidón se encuentra en las raíces (740 g/kg MS), en los tubérculos (690 g/kg MS) y en los cereales grano (430-740 g/kg MS).

#### **2.1.2. Propiedades físicas y químicas del almidón**

El almidón es un polisacárido heterogéneo compuesto por dos tipos de moléculas o polímeros: amilosa y amilopectina (Kotarski *et al.*, 1992; Van Soest, 1994). La **amilosa** es un polímero lineal de unidades de D-glucosa unidas por enlaces tipo  $\alpha(1\rightarrow4)$ . La proporción de amilosa en el grano puede variar del 14 al 34%. La variación en la proporción de amilosa depende de la especie de cereal y de sus variaciones genéticas dentro de la especie. La **amilopectina** es un polímero ramificado, que consiste en una cadena lineal de residuos de glucosa  $\alpha(1\rightarrow4)$ , con ramificaciones  $\alpha(1\rightarrow6)$  cada 20 ó 25 unidades, es mayor que la amilosa, y representa aproximadamente del 70 al 80% del almidón contenido en los cereales grano (Kotarski *et al.*, 1992).

El almidón está formado por gránulos altamente organizados, en los cuales la amilosa y la amilopectina están unidos por puentes de hidrógeno (Nocek y Tamminga, 1991). Los gránulos del almidón son pseudocristales que poseen regiones organizadas (cristalina) y no organizadas (amorfa). La región cristalina o micelar esta compuesta principalmente de amilosa, es resistente a la hidrólisis y al ataque enzimático, y es responsable de la birrefringencia del gránulo del almidón.

La degradabilidad del almidón depende de la relación amilosa:amilopectina (Guilbot y Mercier, 1985). Las variedades con alta amilosa tendrían menor digestibilidad intestinal, lo que puede estar relacionado con la capacidad de la amilasa para limitar la “incubación” y/o con la orientación de las moléculas de amilosa en dirección al interior de los cristales de amilopectina, causando un aumento en los puentes de hidrógeno. Esto limitaría la tumefacción y la hidrólisis enzimática.

Otro factor que afecta la utilización del almidón de los cereales por los animales es la presencia de una matriz proteica alrededor del gránulo, la cual dificulta la acción de las enzimas digestivas (Kotarski *et al.*, 1992). La presencia de la matriz proteica es más alta en los granos de sorgo y maíz que en los demás cereales (Sniffen, 1980). El principal motivo del aumento de la degradabilidad ruminal del almidón del maíz y sorgo, cuando son procesados intensamente, es el aumento del área accesible y la rotura de la matriz proteica (Huntington, 1997; Theurer *et al.*, 1999). Por otra parte, granos de mayor degradabilidad ruminal, como el trigo y la cebada, podrían agravar los problemas de acidosis ruminal.

Las proteínas y los carbohidratos estructurales asociados a los gránulos de almidón podrían alterar la degradación ruminal del mismo. El sorgo, por ejemplo, es uno de los cereales grano que presenta mayor variación en la degradación ruminal, debido a estas asociaciones (McAllister *et al.*, 1993). En cualquier caso, un punto positivo es la alta digestibilidad del almidón en el tracto total, superior al 80%. Esta cifra varía de acuerdo al tipo de grano, a la ingestión, a la proporción que se degrada en rumen y la que llega intacta al duodeno. La digestibilidad del almidón en el intestino delgado también parece ser dependiente del aporte de proteína no degradable en el rumen, ya que el flujo de proteína al duodeno aumenta la secreción de amilasa pancreática (Nocek y Tamminga, 1991).

### **2.1.3. Fuentes de almidón utilizadas en el cebo de rumiantes**

El almidón es el principal nutriente energético en las raciones de rumiantes (producción intensiva) y puede representar del 25 al 35% de la MS en las raciones de vacas lecheras. La utilización óptima del mismo es fundamental para maximizar la producción animal (Theurer, 1986). De acuerdo con el Anuario estadístico de la FAO 2005/06 (FAO, 2007), de entre las principales fuentes de

almidón, los cereales son los cultivos alimenticios más importantes a nivel mundial, con 2270 millones de Tm de producción, siguiendo las raíces y tubérculos con 633 millones de Tm de producción.

### 2.1.3.1. Cereales

Los cereales que más se utilizan en la alimentación de rumiantes son los siguientes: maíz (*Zea mays*), cebada (*Hordeum vulgare L.*), trigo (*Triticum aestivum L.*) y sorgo (*Sorghum bicolor*). De los anteriores el maíz es el que más se usa en la elaboración de concentrados para rumiantes, por ser una fuente rica en almidón y energía. El grano de trigo contiene menos almidón que el maíz y la mandioca, pero más que la cebada (Tabla 1).

**Tabla 1.** Valor nutritivo, degradabilidad teórica y límite máximo de incorporación de diferentes fuentes de almidón utilizadas en el cebo de rumiantes.

Fuente	Valor nutritivo sobre MS <sup>1</sup>				Degradabilidad teórica <sup>2</sup> (%)	Límite de incorporación ovinos cebo <sup>1</sup> (% MS)
	Almidón (%)	PB <sup>3</sup> (%)	FND (%)	EM <sup>4</sup> (Kcal/kg)		
Trigo	59.6	11.2	11.0	2960	90.08	20
Cebada	51.1	11.3	17.0	2850	82.72	50
Avena	38.0	10.5	31.2	2500	70.70	15
Maíz	63.4	7.7	8.0	2900	58.35	40
Sorgo	63.8	8.7	9.0	2820	47.47	35
Mandioca	65.1	4.5	8.5	2600	79.1 <sup>5</sup>	10

<sup>1</sup>FEDNA (2003)

<sup>2</sup>Bacha (2002)

<sup>3</sup>Proteína bruta

<sup>4</sup>Energía metabolizable

<sup>5</sup>Zeoula et al. (1999)

No todos los almidones de los cereales son iguales, y se comportan de forma diferente afectando la digestión y la producción animal. El trigo es un grano desnudo, formado por una cubierta (pericarpio) que recubre a la semilla (testa, endosperma y germen). Las envolturas representan alrededor del 15% del peso del grano y son importantes para la elaboración del afrechillo de trigo. El

endosperma (82% del grano) contiene la fracción más importante, el almidón, y el resto corresponde al embrión o germen. En el maíz y sorgo los gránulos de almidón se encuentran rodeados de una cubierta proteica (matriz) que los protege, no existiendo esta estructura en el trigo. La matriz proteica que envuelve los gránulos de almidón de la cebada es fácilmente degradable en el rumen (FEDNA, 2003). Estas diferencias, así como a la proporción de amilosa y amilopectina en el almidón, tienen relación con los diferentes sitios de digestión del almidón del maíz y del trigo y explican las diferencias nutricionales entre ellos, que radican en la extensión y la velocidad de la digestión del almidón del trigo en el rumen. Herrera-Saldaña *et al.* (1990) determinaron *in vivo* e *in situ* que la degradabilidad ruminal del almidón de diferentes cereales era: avena > trigo > cebada > maíz > sorgo. Bacha (2002), también observó que la mayor velocidad de degradación era para el trigo, la cebada, y la avena, siendo los más lentos el maíz y el sorgo. Esto condujo a una degradabilidad media teórica del 90% para el trigo, mientras que sorgo presentó una degradabilidad del 48% (Tabla 1). La velocidad de degradación debería ser uno de los factores que determinarían el límite biológico de incorporación de materias primas en un pienso (Bacha, 2002).

La cantidad de almidón fermentado en el rumen, tras doce horas de permanencia, es mayor (50% más) para el trigo, cebada y avena que para el maíz. Asimismo, es menor la cantidad de proteína bruta degradada en el rumen en el caso de maíz que cuando se trata de trigo, cebada o avena. Por tanto, en el maíz, hay una mayor cantidad de almidón y proteína bruta que puede escapar a la degradación ruminal y estar disponible para la digestión en tramos posteriores del tracto digestivo (Herrera-Saldaña *et al.*, 1990). En consecuencia, el pH ruminal es menor y la concentración de los ácidos grasos volátiles mayor cuando se incluye trigo en la ración que cuando éste se sustituye por maíz (Philippeau *et al.*, 1999). Por lo tanto, el riesgo de acidosis es mayor cuando los animales consumen trigo que cuando consumen maíz (Owens *et al.*, 1998). Además, la relación acético/propiónico tiende a aumentar a medida que disminuye la cantidad de almidón fermentado en el rumen (Philippeau *et al.*, 1999).

La fermentabilidad ruminal del almidón puede modificarse a través del procesado físico o químico de los granos. Los diferentes métodos desarrollados con este objetivo fueron revisados por Nocek y Tamminga (1991). Los resultados de estos trabajos indican que el método de procesado de los granos puede dar

lugar a un aumento de la disponibilidad de energía para los microorganismos ruminales y, como consecuencia, a una mejora de la utilización de la proteína degradable en el rumen.

### 2.1.3.2. Mandioca

La mandioca es una raíz conocida como yuca, casava o tapioca, de la cual se obtiene la yuca seca, el almidón de yuca, la harina, y subproductos como la raspa.

La mandioca es una especie vegetal de raíces amiláceas, que se cultiva en los trópicos y subtropicos. Pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y al género *Mannihot*, y cuenta con más de 180 especies, siendo la *Mannihot esculentis Crantz* la que tiene importancia económica. Es una fuente rica en energía para raciones de rumiantes (2,60 Mcal de EM/kgMS), aunque de menor valor energético que la cebada (2,85 Mcal/kg MS) (Tabla 1)

**Figura 2.** Raíces, ramas y follaje de mandioca.



La mandioca se debe consumir o someter a un proceso de secado inmediatamente después de ser cosechada, para evitar el alto deterioro que sufren las raíces cuando se exponen a temperatura ambiente. Su follaje se utiliza para alimentación animal (América Latina y África), y también para consumo humano (África). La mandioca se comercializa de diversas formas: fresca y/o procesada para consumo humano, como insumo en la industria alimenticia,

materia prima en la industria productora de alimentos concentrados para animales, y como producto intermediario en la industria no alimenticia. Para el consumo animal, se deben cortar las raíces en trozos delgados y pequeños, que se secan al aire y al sol. Estos trozos pueden ser molidos y prensados en pastillas, lo que facilita su transporte y almacenamiento por periodos largos.

Según Offner et al. (2003), la mandioca contiene niveles de almidón del 69 al 79%, superiores a los de la cebada (53 a 63%). Los polímeros del almidón de la misma tienen forma esférica y semiesférica, representando la amilopectina el 17% del almidón (Morrison y Laignelet, 1983). Debido al alto contenido de amilosa existente en el almidón de la mandioca, se esperaban menores tasas de degradabilidad, sin embargo es altamente degradable, en el rumen (16.8%/h), siendo su degradabilidad inferior a la de trigo (18.8%/h, Nocek y Tamminga, 1991) pero superior a la de la cebada (15.4%/h). Por su parte, el National Research Council, en su publicación sobre alimentación de bovino de carne (NRC, 1996) ha indicado incluso tasas más elevadas de degradación (40%/h) del almidón de la mandioca en el rumen. Lo anterior es probablemente debido a la falta de asociación de los gránulos de almidón con los cuerpos y matrices proteicas, haciendo que la mandioca sea un producto interesante para sustituir parcialmente los cereales como fuente del almidón en la ración. No obstante, hay que tener en cuenta las posibles consecuencias de su alta degradabilidad en rumen.

En una prueba realizada con corderos (peso inicial 14.9 kg y peso final 23.7 kg) que recibieron raciones con diferentes niveles de harina de mandioca (0, 20, 40 y 60%) en sustitución de maíz (Adebowde, 1981), se observó que el nivel óptimo de adición se sitúa entre el 20 y 40%, obteniéndose un beneficio económico del (15%). En cambio, el nivel de inclusión del 60% disminuyó el consumo (-27%), y la digestibilidad de la MS (-23%) y de la PB (-30%).

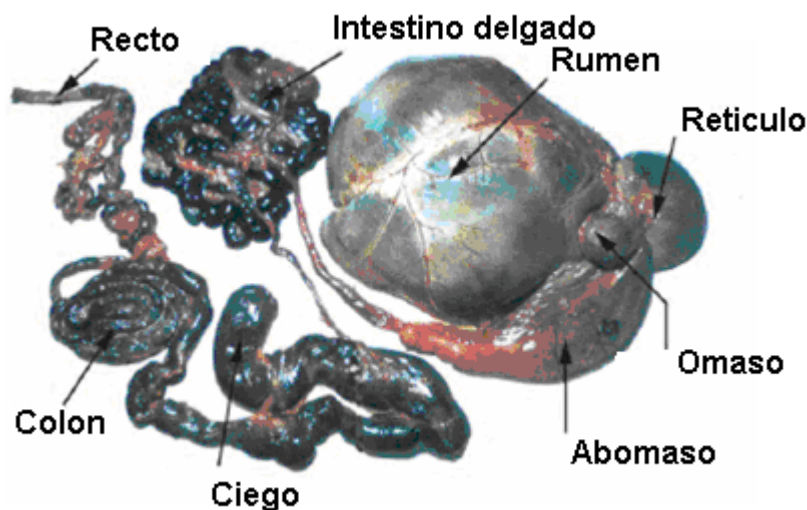
#### **2.1.4. Digestión y fermentación ruminal de los carbohidratos**

Los carbohidratos son los componentes mayoritarios de los alimentos de origen vegetal y constituyen la fuente de principal aporte de energía para los rumiantes. La mayoría de los carbohidratos consumidos por los rumiantes son polímeros de la glucosa que aparecen en forma de celulosa o almidón. Por su parte, la fracción

fibrosa de éstos contiene fundamentalmente celulosa y hemicelulosa, que se encargan de conformar la estructura de la planta. Algunas raciones pueden contener también cantidades importantes de hemicelulosa y pectina. Por consiguiente, para que tenga lugar su fermentación, los carbohidratos deben experimentar en el rumen una hidrólisis previa (Chesson y Forsberg, 1997).

Considerando el tipo de enzimas que llevan a cabo la digestión de los carbohidratos, podemos dividir el tracto digestivo de los rumiantes en tres partes (Figura 3): el retículo-rumen, donde la digestión de los carbohidratos se lleva a cabo por fermentación microbiana, el abomaso y el intestino delgado, donde predomina la digestión por enzimas propias del animal, y el intestino grueso donde, especialmente en el ciego y el colon, se produce una importante fermentación microbiana, aunque siempre de menor magnitud que la que tiene lugar en los preestómagos (Van Soest, 1994).

**Figura 3.** Aparato digestivo de un rumiante adulto mostrando los diferentes compartimentos



Fuente: Russell (2000).

El ecosistema ruminal comprende un sistema anaerobio para las bacterias, protozoos y hongos. Russell y Rychlik (2001) indicaron que las bacterias son los microorganismos más abundantes ( $>10^{10}$  células/g de contenido ruminal, 50% de la masa microbiana), seguidas de los protozoos (aproximadamente  $10^6$  células/g, 40% de la masa microbiana) y, finalmente, los hongos ( $< 10^5$  células/g, 10% de la



masa microbiana). Estos microorganismos, en simbiosis, se adaptan a condiciones de anaerobiosis no estricta, altos ritmos de dilución, altas densidades, y a la depredación de los protozoarios, ya que han desarrollado capacidades para actuar conjuntamente y atacar y degradar alimentos. Las interacciones metabólicas entre estas poblaciones son esenciales para la realización de sus actividades (Van Nevel y Demeyer, 1988).

La fermentación ruminal es el resultado de actividades físicas (motilidad y rumia) y microbiológicas, las cuales convierten los componentes de la dieta en productos que son utilizados (AGV, proteína microbiana y vitaminas del complejo B) o no (metano, CH<sub>4</sub>; y gas carbónico, CO<sub>2</sub>) por el huésped. Algunos de esos productos pueden ser tóxicos, como es el caso del nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>-N) y de los nitratos (Owens, 1988; Van Soest, 1982, 1994).

En el rumen, la digestión de las fracciones degradables del almidón puede ser descrita por un modelo cinético de desaparición en este compartimiento que según Ørskov y McDonald (1979) es definido por dos actividades simultáneas: el ritmo de degradación (Kd) y el de paso (Kp) a través del rumen, cuya relación determina la proporción efectivamente digerida en el rumen ( $Kd/(Kd+Kp)$ ) o, por el contrario, la proporción que abandonaría el rumen sin ser degradada ( $Kp/(Kd+Kp)$ ).

Las bacterias ruminales se pueden clasificar en función del substrato que utilizan, de los productos formados, o de sus requerimientos nutricionales. En función de su substrato de fermentación se clasifican en: bacterias que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteína, pectina, o lípidos, bacterias productoras de metano o de amoníaco, y bacterias con actividad ureasa (Tabla 2). Esta no es una clasificación absoluta, debido a que las bacterias se pueden especializar mucho, poco, o nada en cuanto al tipo de substrato que fermentan, y la mayoría de ellas tienen la capacidad de degradar varios substratos (Yokoyama y Johnson, 1988).

Los productos derivados de la fermentación ruminal de los carbohidratos son los denominados AGV, principalmente acetato, propionato y butirato, aunque también existen en menor cantidad el valérico, caproico, isobutírico, isovalérico y 2-metilbutírico (Van Soest, 1994). Los AGV constituyen la mayor fuente de energía para los rumiantes, pudiendo representar hasta un

**Tabla 2.** Clasificación de las especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan

<p><b>Amilolíticas</b>  <i>Ruminobacter amylophylus</i>  <i>Streptococcus bovis</i>  <i>Succinomonas amylolytica</i>  <i>Bacteroides ruminicola</i>  <i>Bacteroides succinogenes</i></p> <p><b>Celulolíticas</b>  <i>Fibrobacter succinogenes</i>  <i>Ruminococcus albus</i>  <i>Ruminococcus flavefaciens</i>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i></p> <p><b>Hemicelulolíticas</b>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Ruminococcus</i></p> <p><b>Pectinolíticas</b>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Lachnospira multiparus</i>  <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>  <i>Treponema bryantii</i>  <i>Streptococcus bovis</i></p> <p><b>Proteolíticas</b>  <i>Ruminobacter amylophylus</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Streptococcus bovis</i></p> <p><b>Utilizadoras de azúcares</b>  <i>Treponema bryantii</i>  <i>Lactobacillus vitulinus</i>  <i>Lactobacillus ruminus</i></p>	<p><b>Utilizadoras de ácidos</b>  <i>Megasphaera elsdenii</i>  <i>Selenomonas ruminantium</i></p> <p><b>Utilizadoras de lípidos</b>  <i>Anaerovibrio lipolytica</i>  <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>  <i>Treponema bryantii</i>  <i>Eubacterium sp.</i>  <i>Fusocillus sp.</i>  <i>Micrococcus sp.</i></p> <p><b>Productoras de amoníaco</b>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Megasphaera elsdenii</i>  <i>Selenomonas ruminantium</i></p> <p><b>Productoras de metano</b>  <i>Methanobrevibacter ruminantium</i>  <i>Methanobacterium formicum</i>  <i>Methanomicrovrobium mobile</i></p> <p><b>Ureolíticas</b>  <i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>  <i>Selenomonas sp.</i>  <i>Prevotella ruminicola</i>  <i>Ruminococcus bromii</i>  <i>Butyrivibrio sp.</i>  <i>Treponema sp.</i></p>
---	---

Fuente: Yokoyama y Johnson (1988).

80% de los requerimientos energéticos diarios de los animales (Bergman, 1990; Van Soest, 1994). Además de generar energía, la fermentación ruminal de los carbohidratos es esencial para la nutrición proteica del rumiante, debido a la importancia cuantitativa y cualitativa de la proteína microbiana que se sintetiza en el rumen a partir de ellos y de compuestos nitrogenados (Santos et al., 1998).

Los AGV presentan más diferencias en su formación y destino que en su origen, ya que todos ellos provienen mayoritariamente de la degradación de los carbohidratos a sus formas más sencillas, las hexosas. Estas hexosas, a su vez, al ser convertidas en piruvato, permiten la producción de los tres principales AGV (Tabela 3).

**Tabela 3.** Formación de ácidos grasos volátiles a partir de carbohidratos

hexosa	→	2 piruvatos + 4H
piruvato	→	acetato + CO <sub>2</sub> + 2H
2 piruvatos	→	butirato + 2CO <sub>2</sub>
piruvato + 4H	→	propionato + H <sub>2</sub> O
acetato + butirato	→	valerato
CO <sub>2</sub> + 8H	→	metano + 2H <sub>2</sub> O

Fuente: France y Siddons (1993).

La degradación ruminal del almidón por bacterias amilolíticas ocurre a través de la acción de la  $\alpha$ -amilasa extracelular, la cual rompe la molécula del almidón (Yokoyama y Johnson, 1988). Después de la degradación del almidón a maltosa y glucosa, las bacterias sacarolíticas lo fermentan hasta piruvato. Dos moles de piruvato son producidos por cada hexosa, con la producción concomitante de dos adenosinas tri-fosfato (ATP) y de dos nicotinamida adenosin fosfato hidrogenado (NADH<sub>2</sub>). El ATP generado es la principal fuente de energía para el crecimiento y manutención de las bacterias ruminales. El piruvato es la vía intermedia por la cual todos los carbohidratos deben pasar antes de ser convertidos en AGV. El total de estos, así como las proporciones molares de acetato, propionato y butirato producidos en el rumen, dependen del tipo de carbohidrato fermentado, tiempo y extensión de la degradación, especie de bacteria y ambiente ruminal (Bergman, 1990; Van Soest, 1994). Según Ørskov (1986) las raciones ricas en cereales tienden a producir mayor proporción molar de ácido propiónico (35 a 45 mol/100 mL de AGV) en relación a dietas ricas en carbohidratos estructurales (15 a 20 mol/100 mL de AGV).

Además de bacterias, el rumen contiene una población de protozoarios que varía de 10<sup>5</sup> a 10<sup>7</sup>/mL de líquido ruminal (Williams y Coleman, 1997), siendo la

mayoría especies ciliadas que pertenecen a las familias *Isotrichidae* y *Ophryoscolecidae* (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de los protozoos ruminales y sus substratos de fermentación preferentes

Familia	Género	Substrato fermentado			
		Almidón	Azúcares	Celulosa	Hemicelulosa
<i>Isotrichidae</i>					
	<i>Isotricha</i>	×	×		
	<i>Dasytricha</i>	×	×		
<i>Ophryoscolecidae</i>					
	<i>Diplodinium</i>	×		×	×
	<i>Entodinium</i>	×	×		×
	<i>Epidinium</i>	×		×	×
	<i>Ophryoscolex</i>	×		×	×

Fuente: Yokoyama y Johnson (1988).

El almidón es utilizado por los protozoos como fuente de energía, que pueden tener cierto impacto en la fermentación de carbohidratos mediante dos mecanismos (Kotarski et al., 1992):

a) Pueden digerir gránulos de almidón, azúcares solubles y pequeñas partículas de plantas. Esto puede alterar la tasa y extensión de la fermentación del almidón por la menor disponibilidad de substrato para el rápido crecimiento bacteriano.

b) Pueden ingerir bacterias en número suficiente para disminuir la tasa de fermentación ruminal.

Sin embargo, las raciones ricas en cereales disminuyen bruscamente el pH ruminal, y los protozoarios son muy sensibles a pH inferior a 6.0. En este caso no participan activamente en la modulación de la tasa de fermentación del almidón, debido a la disminución de su población. Ørskov (1992) atribuye a los protozoos una función de estabilización de la fermentación, controlando el nivel de nutrientes y asegurando una fermentación más uniforme durante los periodos entre comidas, evitando así grandes fluctuaciones de pH. Los protozoarios tienen una función importante en la degradación del almidón, engullen los gránulos, los fermentan

intracelularmente y almacenan el exceso de energía como amilopectina, evitando su rápida degradación por parte de las bacterias y un descenso pronunciado del pH ruminal (Mackie et al., 1978). Sin embargo, debido a que el H<sub>2</sub> es uno de los principales metabolitos de desecho de los protozoos durante el metabolismo de los carbohidratos, la defaunación se ha descrito como posible mecanismo de inhibición de la metanogénesis (Demeyer y Van Nevel, 1975).

Cuando los rumiantes se alimentan con raciones ricas en almidón, aumenta la producción de propionato, baja la producción de metano y disminuye la proporción acetato/propionato, además la disminución del pH inhibe las bacterias metanogénicas (McAllister et al., 1996). El CH<sub>4</sub> es producto del CO<sub>2</sub> y del H<sub>2</sub>, principalmente derivados de la fermentación de las hexosas a acetato (Wolin y Millar, 1988; Weimer, 1998). Con la inhibición de las bacterias metanogénicas, disminuye la producción de acetato y aumenta la producción de propionato. Las eficiencias de captación de la energía de las hexosas en la síntesis de los principales AGV son 109, 78 y 63% para el propionato, el butirato, y el acetato, respectivamente (Richardson et al., 1976; Macgregor, 1988).

Se ha demostrado que, si existen suficientes carbohidratos para la producción de ATP, la mayor parte de los aminoácidos disponibles pueden ser incorporados directamente a la proteína microbiana en vez de ser desaminados (Russel et al., 1991). Si, por el contrario, los carbohidratos son escasos, los aminoácidos se utilizan como fuente de energía y aumenta la producción de amoníaco.

El epitelio de los pre-estómagos (rumen, retículo y omaso; Figura 3), es no glandular y en vías de queratinización, y en el rumiante adulto está cubierto de grandes papilas, que amplían la superficie de absorción ya que su función es absorber y metabolizar los AGV hasta un 80-90%; el resto de AGV se absorbe a nivel del omaso y abomaso (Weston y Hogan, 1968; citado por France y Siddons, 1993).

En condiciones normales, cuando se produce un aumento en la concentración de AGV en animales que consumen elevadas proporciones de almidones, se produce un incremento el grosor de la mucosa y de la longitud de las papilas del rumen, lo cual aumenta la capacidad de absorción a través de la mucosa ruminal (Nocek, 1997; Calsamiglia y Ferret, 2002; Kleen, 2003; Oetzel, 2003). La estimulación provocada por los diferentes AGV no es la misma, siendo el butirato

el ácido con mayor efecto estimulador de las papilas ruminales, seguido del propionato (Heinrichs, 2005)

Los principales AGV se absorben a través del epitelio ruminal, pero luego se metabolizan de distinta forma. El butirato se metaboliza a nivel de epitelio ruminal, formando cuerpos cetónicos, mayoritariamente ácido  $\beta$ -hidroxibutírico y en menor medida acetocetona y acetona, que son oxidados en los músculos cardíaco y esquelético, y se usan para la síntesis de ácidos grasos en el tejido adiposo y en la glándula mamaria. El acetato se metaboliza en pequeña proporción a cuerpos cetónicos, la mayor parte pasa a circulación sistémica para ser oxidado, vía ácido tricarbóxico o utilizado como precursor de la liposíntesis. El propionato es transportado casi en su totalidad al hígado (a través de circulación porta), donde es oxidado o utilizado como precursor de la glucosa (Brockman, 1993; Fahey y Berger, 1993). Existen otro tipo de ácidos grasos, llamados de cadena ramificada, que no tienen como origen los carbohidratos, sino los aminoácidos. Entre ellos se encuentran el isovalerato, el 2-metilbutirato y el isobutirato, que provienen de la leucina, la isoleucina y valina, respectivamente. La desaminación y degradación de estos aminoácidos es de especial importancia para el crecimiento bacteriano en el rumen, particularmente de las bacterias celulolíticas (Owens y Zinn, 1993).

En corderos de cebo, pueden presentarse problemas cuando la proporción de ácido propiónico es más alta de lo normal, superando la capacidad del hígado para metabolizarlo. En ese caso, tanto el ácido propiónico como su intermediario, el ácido metilmalónico, aparecen en la sangre periférica. De este modo, interfiere la síntesis normal de la grasa y se forma una gran cantidad de ácidos grasos de cadena ramificada, formando grasa blanda, inadecuada e indeseable para el comercio (Faez et al., 1994).

Los nutrientes que llegan al intestino delgado pueden ser digeridos por las enzimas hepáticas, pancreáticas y entéricas, de tal manera que los productos finales de la digestión de los carbohidratos son absorbidos para ser transportados por vena porta. En este caso, el compuesto que se absorbe es glucosa, la cual procede, fundamentalmente, de la digestión del almidón que escapa a la fermentación ruminal. En cambio, los carbohidratos fibrosos no pueden ser digeridos en este tramo del tracto digestivo, al carecer de enzimas apropiadas para su hidrólisis (Van Soest, 1994). La absorción de glucosa procedente de la digestión intestinal de los carbohidratos constituye un proceso energéticamente

más eficiente que la fermentación en el rumen o en el ciego, en donde da lugar a la formación de ácidos grasos volátiles (Rowe et al., 1999).

La digestión en el intestino grueso compensa parcialmente la disminución de la digestibilidad total, como consecuencia de una menor fermentación ruminal de los carbohidratos (López et al., 2000). No obstante, los productos resultantes de la fermentación microbiana en este punto no pueden ser utilizados en su totalidad por el rumiante, lo que redundaría, en último lugar, en una disminución de la eficiencia de utilización del alimento (Ørskov et al., 1969; Hoover, 1978).

## **2.2. ACIDOSIS RUMINAL**

La alimentación de los rumiantes con raciones ricas en concentrados es una práctica común en las explotaciones de cebo intensivo. El tipo de carbohidratos aportado a la ración condiciona de forma notable la actividad fermentativa microbiana ruminal (Sniffen et al., 1983) y va a tener una repercusión importante sobre el pH en el rumen (Sauvant et al., 1999).

Cuando el animal consume raciones con elevadas cantidades de cereales u otras fuentes de carbohidratos fácilmente fermentecibles, y limitadas cantidades de alimentos fibrosos (paja), el pH ruminal puede descender por debajo de los valores fisiológicos (Nordlund, 2003; Slyter, 1976; Owens et al., 1998), produciéndose acidosis.

La acidosis es un proceso derivado de la acumulación de AGV y ácido láctico en el rumen (Slyter, 1976; Nocek, 1997; Owens y Goetsch, 1998) y supone una disminución del álcali (base) en relación al contenido de ácido (iones hidrógeno). Se caracteriza por un aumento de la concentración de  $H^+$ , en primer lugar en el rumen y, en estado más avanzado, en los distintos fluidos corporales (Stedman's, 2007).

El pH ruminal representa un balance de las concentraciones relativas de bases, ácidos y sustancias tampón, siendo la base primordial el amonio. Los tampones primarios son el bicarbonato y el fosfato. Aproximadamente el 50% del bicarbonato que entra al rumen proviene de la saliva, durante el consumo de alimento y la rumia, la otra mitad entra al rumen por el intercambio de ácidos ionizados que llegan a ser absorbidos. Las fuentes de bicarbonato de la dieta o de

la saliva ayudan a aumentar el pH ruminal, estimulando la utilización del lactato (Owens et al., 1998).

La acumulación de lactato provoca una disminución del pH por debajo de 6,0 y, si persiste por periodos de tiempo prolongados, causa acidosis ruminal, lo que provoca una serie de alteraciones microbianas y fisiológicas que culminan en una reducción de la ganancia de peso de animales en cebo, debido al inconsistente consumo de alimento, diarrea y úlceras ruminales (Nocek, 1997).

El pH en el rumen varía en un rango de 5,0 a 7,2, dependiendo del tipo de ración y del manejo de la alimentación (Owens y Goetsch, 1988). Los rumiantes que consumen forrajes como ración base mantienen un pH de 6,8, mientras que los que consumen concentrados tienen un pH de 5,8 o menor (Church, 1993).

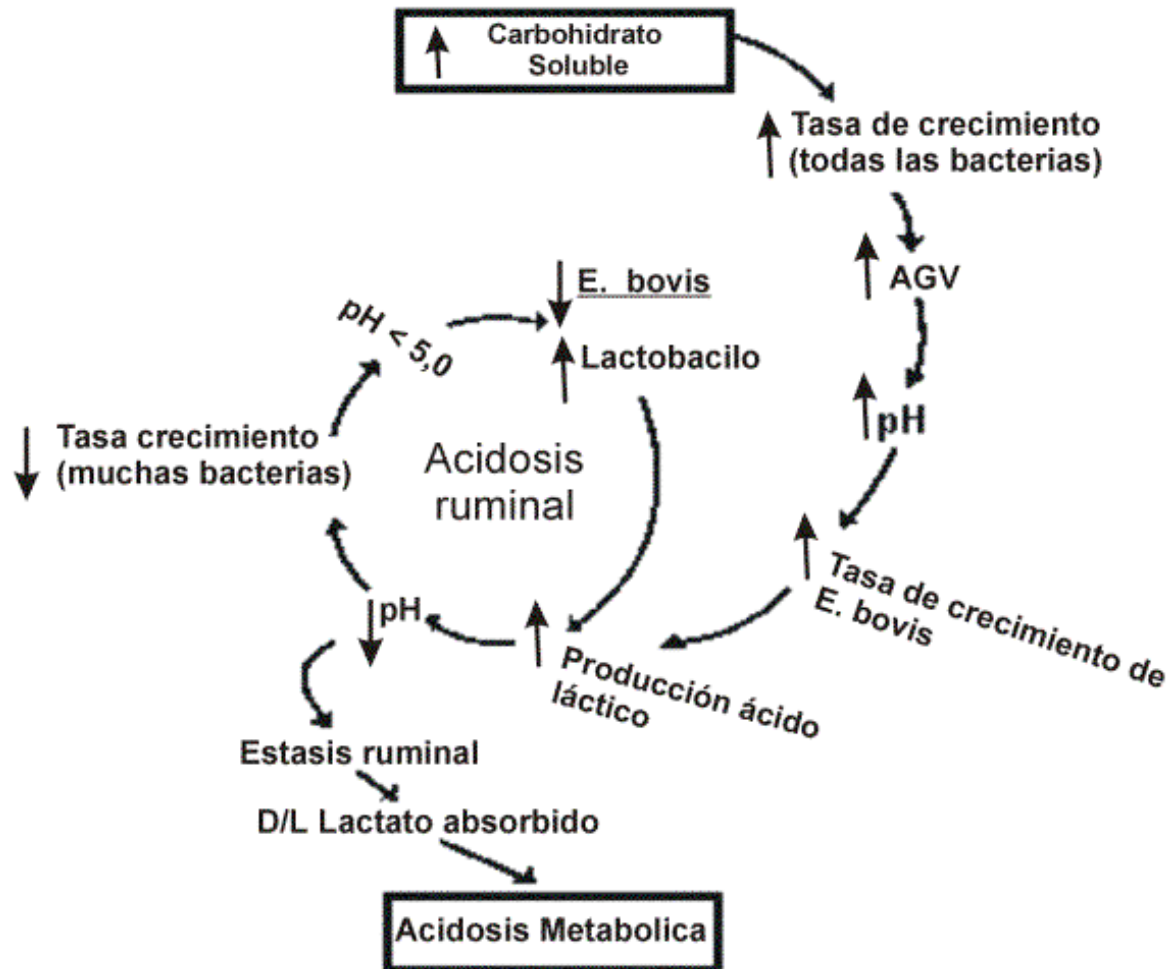
Se distinguen dos formas de acidosis: la aguda y la crónica (Nocek, 1997; Stone, 2004). La acidosis aguda recibe el nombre de acidosis láctica, debido al papel que juega el ácido láctico en el proceso patológico (Elam, 1976) y se caracteriza por la rápida reducción del pH ruminal  $\leq 5,0$  (Hibbard *et al.*, 1995). Esta forma de acidosis es consecuencia del consumo de grandes cantidades de carbohidratos rápidamente fermentecibles (Enemark *et al.*, 2002). También ocurre cuando hay un cambio brusco de una ración rica en forraje a otra rica en concentrados (Owens *et al.*, 1998). Sauvant *et al.* (1999) observaron un descenso acusado del pH ruminal en animales que consumieron el alimento con avidez, ingiriendo una gran cantidad de alimento en poco tiempo. El diagnóstico de la acidosis aguda tiene lugar cuando se determina un pH sanguíneo inferior a 7,35, aunque muchas veces se utilizan como indicadores otros síntomas clínicos en el animal, como puede ser: pH ruminal bajo ( $\leq 5,2$ ), anorexia, oscilaciones en la ingestión de alimentos, diarrea y letargia del animal (Owens *et al.*, 1998)

La acidosis subclínica (crónica) es la consecuencia de periodos transitorios y repetidos de pH ruminal moderadamente bajo  $\leq 5,6$  (Nocek, 1997), que no son suficientes para desencadenar la sintomatología clínica de la acidosis aguda (Calsamiglia y Ferret, 2002). Sin embargo la ingestión de alimento y la producción de los animales se reducen y/o son irregulares (Owens et al., 1998). El pH ruminal varía mucho a lo largo del día y refleja la mayor o menor concentración de ácidos en el rumen, que esta relacionada directamente con los carbohidratos que se fermentan en el rumen después de cada comida. El desarrollo de la acidosis láctica sigue una trayectoria espiral con retroalimentación positiva (Figura 4), de



tal manera que si persiste el aporte de carbohidratos, la sucesión de eventos da lugar a una acidosis metabólica (Nocek, 1997)

**Figura 4.** Esquema de la acidosis ruminal



Fuente: Nocek (1997)

El pH del rumen es un parámetro físico-químico esencial en la digestión y la nutrición, asociándose un pH bajo con una serie de desórdenes de tipo nutritivo y patológico (Sauvant et al., 1999). La reducción del pH está determinada por la fermentabilidad de la ración, la frecuencia de administración del alimento y/o la adición de sustancias tampón (Mould y Ørskov, 1984). La participación del almidón en la acidogénesis ruminal depende de la cantidad del mismo en la ración, teniendo una especial importancia su velocidad de degradación, independientemente del porcentaje. En este sentido, Sauvant et al. (1994) observaron una relación directa entre la velocidad de degradación del almidón y la disminución de pH en rumen. La cantidad total de carbohidratos rápidamente

fermentables ingeridos es, probablemente, más importante que el porcentaje de los carbohidratos en la dieta (Oetzel, 2003).

En animales que se adaptan paulatinamente al consumo de raciones con elevadas proporciones de almidones, se produce un incremento en el grosor de la mucosa y en la longitud de las papilas del rumen, lo cual aumenta la capacidad de absorción de los AGV a través de la mucosa ruminal (Nocek, 1997; Calsamiglia y Ferret, 2002; Kleen, 2003; Oetzel, 2003). Sin embargo, en mucosas no adaptadas, la absorción es lenta, y la acumulación de AGV provoca una acidosis ruminal subclínica, que puede causar una reducción de la digestibilidad de la ración y oscilaciones en la ingestión de MS (Calsamiglia y Ferret, 2002), disminución de la producción de leche, reducción de grasa en leche, pobre condición corporal (a pesar del adecuado consumo de energía) y diarrea (Nocek, 1997).

Estudios *in vivo* han demostrado que cuando se induce una acidosis subaguda se producen disminuciones en la digestibilidad de la materia seca y de la fibra de la ración (Plaizier et al., 2001), relacionadas con una disminución en el pH del rumen y de la actividad celulolítica (Wedekind et al., 1986).

Los aumentos en la presión osmótica (PO) intraruminal y la prolongada exposición de los tejidos ruminales al ácido láctico, permiten el desarrollo de poblaciones de clostridios y coliformes que dañan la mucosa ruminal provocando ruminitis aguda. Los grupos de papilas inflamadas cambian a papilas necróticas, con hemorragias en mucosa y submucosa, oscureciendo el tejido, que posteriormente se transforman en úlceras, hiperqueratosis y paraqueratosis. Lo anterior causa pérdida de elasticidad del rumen, y disminución de la ingestión de alimentos y de la capacidad de absorción de los AGV (Kimberling, 1988; Owens et al., 1998). La tasa de absorción de AGV disminuye (43%), y se reduce la energía metabolizable (23 a un 32%), lo que podría explicar la reducción en la eficiencia de utilización de los alimentos por parte de los rumiantes después de una acidosis grave (Krehbiel et al., 1995). Además, el rendimiento de los animales también se puede ver afectado por problemas sanitarios asociados a este proceso como son laminitis, ruminitis y abscesos hepáticos (Nocek, 1997). Estos problemas no solamente tienen importancia económica, sino que además comprometen el bien estar animal.

Para prevenir o controlar la acidosis, Calsamiglia y Ferret (2002), recomiendan algunas estrategias relacionadas con el manejo de la alimentación y la formulación de raciones:

- Controlar la velocidad de generación de ácido, teniendo en cuenta el nivel y la velocidad de degradación del almidón a la hora de formular piensos.
- Favorecer la rumia, con el suministro de FND forrajera adecuada, cuidando el tamaño de la partícula.
- Equilibrar las raciones para optimizar la síntesis de proteína microbiana.
- Utilizar con preferencia ingredientes con una capacidad tamponante elevada.
- Adaptar la microflora ruminal a la producción de ácido para desarrollar la población utilizadora de láctico y estimular su absorción.

La adaptación a raciones con una elevada proporción de concentrados tiene dos componentes: 1) Un componente microbiano, relacionado con el equilibrio entre las bacterias utilizadoras y productoras de ácido láctico, y 2) El desarrollo de las papilas ruminales (Oetzel, 2003) ya que un aumento en la longitud proporcionaría una mayor superficie de absorción de AGV, lo que conllevaría al mantenimiento del pH dentro de un rango óptimo.

La glucosa es liberada de los gránulos del almidón por cepas específicas de microorganismos que atacan las partículas de cereal. La presencia de glucosa libre en el rumen puede tener por lo menos tres efectos adversos: 1) Las bacterias ruminales, que normalmente no son competitivas, crecen rápidamente cuando son abastecidas con grandes cantidades de glucosa. Un ejemplo es *Streptococcus bovis*, bacteria gran positiva, causante de la producción de grandes cantidades de ácido láctico (Styler, 1976; Owens et al., 1998). 2) Otros microorganismos oportunistas, incluyendo coliformes, pueden crecer en el rumen y producir durante la lisis la liberación de endotoxinas o amidas (histamina) cuando la glucosa es realmente disponible. 3) La glucosa liberada del almidón incrementa la osmolaridad del contenido ruminal. Un incremento en la osmolaridad exacerba la acumulación de ácido dentro del rumen, con la inhibición en la absorción de los AGV. Cuando el pH disminuye a 5,0 durante la acidosis, la ionización de ácidos se incrementa ligeramente, pero al aumentar el lactato se incrementa la concentración del ión hidrogeno. El lactato deprime el pH más drásticamente que cualquier otra cantidad similar de ácidos ruminales porque su pK (punto de máxima amortiguación) es considerablemente más bajo (3,1) que el

de los AGV producidos en el rumen (promedio 4,8). La acidez aumenta la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa incrementando la conversión de piruvato a lactato y complicando la recuperación de la acidosis (Dawson y Allison, 1988; Owens et al., 1998).

Con dietas ricas en forraje los rangos de osmolaridad ruminal normalmente son de 240 a 265 mOsm/L, y con dietas ricas en concentrados de 280 a 300 mOsm/L. En sangre, la proteína disuelta contribuye substancialmente a la presión osmótica que normalmente es de 285 a 310 mOsm. En condiciones de acidosis la osmolaridad ruminal llega a 515 mOsm/L. Cuando la osmolaridad ruminal es más grande que en sangre, el agua de la sangre es atraída rápidamente al interior de la pared ruminal. El daño causado a la pared ruminal o del intestino delgado debido a la alta presión osmótica es detectado más tarde por la presencia de abscesos. La elevación de la presión osmótica en el rumen es percibida por la pared del retículo rumen lo que inhibe el consumo de alimento, además de inhibir la digestión bacteriana de fibra y almidón, causando que el fluido se estanque (Owens et al., 1998).

Los procesos de acidosis también pueden ir acompañados de diarrea. Las heces son por lo general algo brillantes y acuosas y, como el patrón de la ingestión, siguen los descensos y subidas del pH (Bach, 2002). La pérdida de agua corporal, ya sea por flujo de ésta hacia el rumen o bien por la diarrea, provoca deshidratación (Huber, 1976; Mohamed Nour et al., 1998).

### **2.3. Alternativas para manipular la fermentación ruminal**

El desafío actual de la explotación pecuaria es establecer sistemas de producción de rumiantes rentables y sostenibles que respeten el bienestar animal y cuyos productos no supongan un riesgo para la salud del consumidor o el medio ambiente. Una de las estrategias para mantener los niveles de producción sin reducir los rendimientos es la utilización de aditivos legalmente permitidos y cuya eficacia se demuestre en los animales (Caja et al., 2003).

La búsqueda de nuevos aditivos y su inclusión en la industria pecuaria puede ser justificada por las siguientes razones (West, 2004):

1. Ayudan a mantener un ambiente ruminal deseable en raciones con más concentrado y menos forraje.
2. Son frecuentemente necesarios en momentos fisiológicos y productivos de mayores necesidades nutricionales (gestación, inicio de lactación, cebo intensivo, animales de alto potencial genético, entre otros).
3. Mayor actividad metabólica del animal, lo que requiere de la suplementación con nutrientes para alcanzar el adecuado balance.
4. Mejoran en general las funciones microbianas ruminales y pueden incrementar la digestión de la fibra, así como la biosíntesis proteica.
5. Algunos pueden aumentar la inmunidad de los animales y su resistencia a determinadas enfermedades.

Sin embargo, el empleo de aditivos nunca va a servir para mejorar los sistemas de explotación que no estén optimizados (Acedo-Rico, 1998). Si no hay un buen programa de alimentación y un manejo adecuado, de nada sirve el empleo de aditivos por eficientes y baratos que sean. Es importante una formulación correcta de las raciones y un manejo adecuado de la alimentación para se esperar beneficios adicionales mediante el uso de aditivos que modulen la fermentación ruminal (Calsamiglia et al., 2006).

La modificación de la composición microbiana ruminal y de las actividades microbianas puede ser llevada a cabo por medio de aditivos que afecten selectivamente los microorganismos del rumen, introduciendo microbios externos dentro del mismo o potenciando, por manipulación genética, los propios microorganismos ruminales (Domínguez-Bello y Escobar, 1997).

Según Caja et al. (2003), los mecanismos de acción de muchos probióticos se basan fundamentalmente en la “competencia de exclusión”, que se puede resumir en: 1) competición por los receptores que permiten la adhesión y colonización de la mucosa intestinal; 2) competición por determinados nutrientes; 3) producción de sustancias antimicrobianas; y 4) estimulación de la inmunidad de la mucosa y sistémica del hospedador.

Cuando se agotan las alternativas del manejo nutricional de la ración, podemos recurrir a la utilización de aditivos alimentarios para mejorar la eficiencia de producción y reducir las pérdidas de nutrientes, estimulando el metabolismo

energético. Debido a la gran diversidad de factores que regulan el ecosistema ruminal, son muchas las vías posibles para su manipulación (Chalupa, 1988). Algunas de ellas actúan directamente sobre los microorganismos y/o sus actividades, y otras lo hacen indirectamente, a través de la dieta o la modificación de las condiciones ruminales, que favorecen o disminuyen el crecimiento de poblaciones microbianas concretas (Van Nevel y Demeyer, 1988). Calsamiglia et al. (2006) consideran los siguientes aspectos como objetivos de la modulación en la fermentación microbiana ruminal (Figura 5):

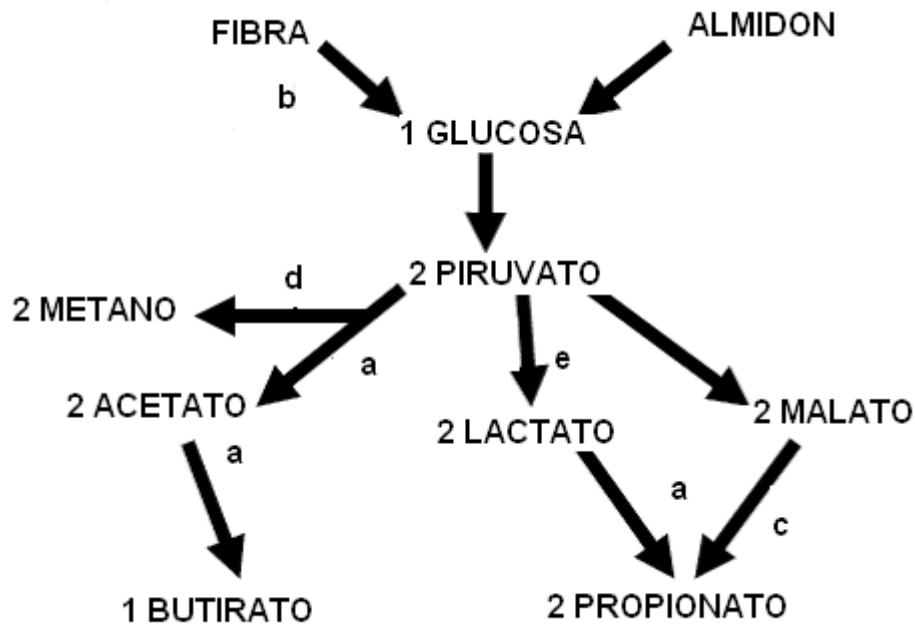
1. Aumentar la degradación de la fibra y el almidón, y la producción de AGV.
2. Estimular la producción de propionato.
3. Inhibir la producción de metano.
4. Controlar la concentración de lactato y el pH ruminal.

En las últimas décadas, el uso de antibióticos promotores del crecimiento ha demostrado ser eficaz en mejorar la productividad de los rumiantes en crecimiento, y al parecer sus efectos son el resultado de reducir específicamente bacterias gram-positivas (Kalmokoff et al., 1996), cuyos productos de la fermentación son principalmente acetato, butirato, hidrógeno y el ácido láctico. En consecuencia, la eficacia de utilización de la energía mejora debido al incremento en la producción de propiónico y la reducción de la producción de acetato y de CH<sub>4</sub>. El exceso de hidrógeno generado por la inhibición directa de la metanogénesis debe incorporarse a otros productos finales de la fermentación como el propiónico y el butirato (Van Nevel y Demeyer, 1988). El incremento de propionato puede en parte explicar la reducción de la ingestión de materia seca que se observa cuando se administran ionóforos. Erasmus et al. (1999), usando Lasalocid, incrementaron la eficiencia en la producción de leche en vacas primíparas, con disminución en el consumo de alimento, sin afectar la producción de leche, ni la composición láctea y la condición corporal de vacas Holstein.

No obstante, en respuesta a la creciente preocupación pública por el uso de antibióticos en la industria alimentaria animal, debido a la posible aparición de residuos y resistencias cruzadas con bacterias causantes de enfermedades en humanos (Gustafson y Bowen, 1997), en Enero de 2006 entró en vigor en la UE una nueva Directiva (1831/2003/CEE) según la cual los antibióticos distintos de

los coccidiostáticos o de los histomonostatos no se autorizan como aditivos para la alimentación animal.

**Figura 5.** Rutas de acción de los aditivos en el metabolismo energético (a = monensina; b = aditivos microbianos; c = ácidos orgánicos; d = extractos de plantas; e = inmunización/anticuerpos)



Fuente: Calsamiglia et al. (2006)

La alternativa a estos antibióticos sería la implantación de nuevas estrategias de manejo y alimentación, o la utilización de aditivos alternativos que tengan efectos similares a los antibióticos promotores de crecimiento. Como sustancias alternativas destacan los aditivos microbianos (bacterias, enzimas exógenas, levaduras, hongos), los ácidos orgánicos (malato y fumarato), y algunos extractos de plantas, que han demostrado ser eficaces en la mejora del rendimiento de los animales, disminuyendo las pérdidas energéticas y proteicas a nivel ruminal.

### 2.3.1. Aditivos microbianos

En el rumen existen bacterias que producen lactato y bacterias que lo utilizan como fuente de energía. El balance entre estos dos grupos determina si se

acumula o no. Si se inhiben los microbios productores de lactato y se mejora la actividad de los que lo utilizan, se puede reducir la incidencia de acidosis aguda y subaguda (Owens et al., 1998).

Los aditivos microbianos (probióticos) también denominados “Direct-fed microbial”, son cultivos simples o mezclas de microorganismos vivos que, aplicados a los animales o al hombre, benefician al huésped, mejorando las propiedades de la microflora intestinal (Havenaar y Huis, 1992). Estos aditivos suelen estar constituidos por bacterias capaces de producir ácido láctico, pero también incluyen bacterias no lácticas, levaduras y hongos. Algunos probióticos también regulan la caída del pH ruminal y pueden regular la producción de lactato en rumen.

En el caso particular de las enzimas fibrolíticas, su adición a las raciones de bovinos puede aumentar la producción de leche (Kung et al., 2000; Yang et al., 2000) y la ganancia de peso (Beauchemin et al., 1995). Con frecuencia, estas mejoras se han atribuido a aumentos en la eficacia de utilización de los alimentos en el tracto digestivo y en particular a mejoras en la digestibilidad de algunos de los componentes fibrosos de la ración *in situ* e *in vitro* (Feng et al., 1992) y en terneros (Beauchemin et al., 1995). Por su parte, al suplementar la ración de vacas lecheras con cultivos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), disminuyó la concentración de L-láctico y aumentó el pH ruminal (Williams et al., 1991), posiblemente debido a la estimulación del crecimiento de las bacterias utilizadoras de lactato.

En corderos alimentados con heno de alfalfa, Pinos-Rodriguez et al. (2002) observaron que las enzimas fibrolíticas (5 g/d vía intraruminal) aumentaron la ingestión de alimento, la concentración total de AGV y la digestibilidad de la proteína y de la fibra. Sin embargo no observaron diferencias en corderos alimentados con ray-grass. McAllister et al. (2000) no observaron ningún efecto de las enzimas fibrolíticas sobre la ingestión de alimento, la ganancia de peso ni la digestibilidad de nutrientes en corderos alimentados tanto con raciones forrajeras como ricas en concentrado. Por su parte Flores (2004), en ovejas, y González (2004), en cabras lecheras, observaron que la aplicación de una dosis de 0,47 mL/kg MS de un producto enzimático con actividad celulasa y xilanasas no mejoró los resultados productivos. En cambio, Bouattour (2007), utilizando el mismo producto enzimático en la ración de ovejas lecheras, pero a una dosis superior (2



mL/kg de MS) y aplicado al forraje 24 h. antes de ofrecerlo al ganado, observó mejoras en la digestibilidad de la MS y de la FND, así como en la producción de leche.

### **2.3.2. Extractos de plantas**

Algunos extractos de plantas pueden tener actividad antimicrobiana para modular el perfil de fermentación ruminal a través de sus metabolitos secundarios (saponinas, taninos y aceites esenciales). Resultados de estudios con saponinas (extracto de yucca) muestran que los efectos sobre el metabolismo energético son pequeños y muy variables debido, en parte, a las dosis utilizadas y a la variabilidad en el contenido de saponinas de los extractos. Además, en estudios *in vitro* se ha observado que las respuestas varían en función del pH ruminal (Cardozo et al., 2005).

Busquet et al. (2005) observaron que el extracto de ajo y el cinamaldehído reducen la proporción molar de acetato y de AGV ramificados, y aumentan las proporciones molares de propionato y butirato. La administración de cinamaldehído a vacas lecheras redujo además la ingestión de MS de concentrado, y la producción de leche aumentó en 1 L/d, aunque las diferencias no fueron significativas. La disminución en el consumo de concentrado debido al cinamaldehído parece indicar que este aditivo disminuye la palatabilidad del alimento (Busquet et al., 2003).

### **2.3.3. Inmunización**

La inmunización de los animales con vacunas preparadas a partir de *Streptococcus bovis* y *Lactobacillus spp.*, podría ayudar a disminuir la producción de ácido láctico en el rumen, uno de los principales factores que determinan la acidosis ruminal. El método consiste en inmunizar al animal mediante vacunas inactivadas o atenuadas vía intramuscular. Los anticuerpos son secretados a través de la saliva, por lo que aumenta su concentración en rumen, llegando a neutralizar dicha población bacteriana. Shu et al. (1999, 2000a) demostraron que estas vacunas disminuyen la concentración de ácido láctico y el número de *S. bovis* y *Lactobacillus* en terneros inmunizados. Estos resultados fueron

confirmados en ovinos (Shu et al., 2000b) registrando aumentos de pH provocando a su vez aumentos en la ingestión de alimento.

También se han probado preparaciones de anticuerpos policlonales contra ciertas bacterias ruminales. Dahlen et al. (2004), suplementando raciones de terneros ricas en concentrado con anticuerpos policlonales (obtenidos de huevos de gallinas inmunizadas frente a *S. Bovis* y *fusibacterium nechrophorum*), observaron mejoras en la GMD y el IC. En terneros suplementados con anticuerpos policlonales, Dilorenzo et al. (2005) obtuvieron igualmente mejoras en el IC y disminuciones en la incidencia de abscesos hepáticos

#### **2.3.4. Ácidos orgánicos**

Otra alternativa para mejorar la fermentación ruminal, y en particular para disminuir la acumulación de ácido láctico en el rumen de los animales alimentados con dietas ricas en almidón, es la inclusión de ácidos dicarboxílicos en la ración, particularmente fumarato y malato, los cuales estimulan la utilización del ácido láctico (Martin, 1998) y, por tanto, mejoran la utilización de los productos finales de la digestión.

Los ácidos orgánicos están presentes de forma natural en los tejidos biológicos de los vegetales y animales. Son productos intermedios de algunos ciclos metabólicos, y algunos de ellos se producen también en el tracto digestivo de los animales durante los procesos de fermentación, o bien se incorporan de forma intencionada a las raciones (Beuchat y Golden, 1989). Cuando se utilizan como aditivos, los ácidos orgánicos pueden ser administrados como tales, pero su manejo es problemático, ya que son líquidos corrosivos; por ello, resulta más conveniente la utilización de sus sales, que son sólidas y más fáciles de manipular y dosificar (Caja et al., 2003).

Los ácidos orgánicos, cuyas principales características se presentan en la Tabla 5, se utilizan frecuentemente como aditivos en la alimentación de animales monogástricos para controlar patologías digestivas. Su utilización se remonta a mediados de los años 60, en forma de ácido láctico en ganado porcino (Burnet y Hanna, 1963), y constituyen una alternativa interesante que podría paliar el efecto de la supresión de los antibióticos utilizados como promotores de crecimiento,

debido a su capacidad de mejorar las respuestas productivas (Edmonds et al., 1985).

Uno de los puntos de mayor interés del empleo de ácidos orgánicos en rumiantes es controlar la acumulación de lactato en el rumen, lo que se intenta conseguir por medio de la estimulación de los microorganismos utilizadores de lactato y estimuladores de la síntesis de propionato (Caja et al., 2003). Los datos sobre el uso de ácidos orgánicos en rumiantes, sin embargo, son limitados. De hecho, la mayoría de las experiencias realizadas en estos animales se reducen a los ácidos fumárico y málico, ácidos dicarboxílicos que intervienen en el metabolismo del piruvato (Caja et al., 2003).

**Tabla 5.** Caracterización química de los principales ácidos orgánicos utilizados en alimentación animal

Nombre del ácido	Formula	Pk <sub>a</sub>	Solubilidad en agua	EB (Kcal/kg)
Fórmico	CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3.75	Muy buena	1.386
Acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	4.75	Muy buena	3.537
Propiónico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	4.87	Muy buena	4.971
Láctico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	3.08	Buena	3.609
Fumárico	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	3.0–4.4	Regular	2.748
Málico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub>	3.4–5.1	Buena	2.390
Tartárico	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub>	3.0–4.4	Buena	1.864

Fuente: Nielsen (2001)

Los ácidos orgánicos fumárico, málico y aspártico son productos intermedios de una de las vías metabólicas (succínica) por la cual el piruvato se transforma en ácido propiónico, evitando la vía que formaría lactato (Figura 6). El ácido propiónico es absorbido en el rumen y la mayor parte es transportado al hígado, que lo metaboliza dando lugar a glucosa, importante fuente de energía para el animal hospedador o precursor de la síntesis de lactosa, proteína y grasa corporal (Murray et al., 1992; Ralphs et al., 1995; Ranilla y Carro, 2003; Caja et al., 2003).

Los microorganismos primarios utilizadores de ácido láctico son *Propionibacterium shermanii* y *Selenomonas ruminantium* (Nocek, 1997). *S. ruminantium* es una bacteria ruminal gram negativa que puede llegar a

representar más de 51% del total de bacterias viables en el rumen de animales que reciben dietas ricas en almidón (Caldwell y Bryant, 1996). Esta bacteria merece una atención especial porque, además de fermentar un gran número de monosacáridos para producir ácido acético, propiónico y láctico, es útil en la captación y utilización del lactato, evitando su concentración en el rumen (Stewart y Bryant, 1988). Sin embargo, para que la bacteria utilice el ácido láctico para formar succínico y propiónico, es necesaria la presencia de malato en el medio como principal estimulador (Nisbet y Martin, 1990).

Otro efecto benéfico del malato y fumarato es una reducción de la producción de metano ( $\text{CH}_4$ ). Cuando el hidrogeno ( $\text{H}_2$ ) esta disponible en el rumen, las bacterias *S. ruminantium* pueden fermentar fumarato y malato para producir succinato y propionato. Esta vía permite la disminución de la concentración de  $\text{H}_2$  en el rumen, reduciendo la cantidad de  $\text{H}_2$  disponible para formar  $\text{CH}_4$ , tanto en el caso del fumarato (Asanuma et al., 1999; López et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003) como en el del malato (Kung et al., 1982; Carro et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003; Mohammed et al., 2004; Foley et al., 2007).

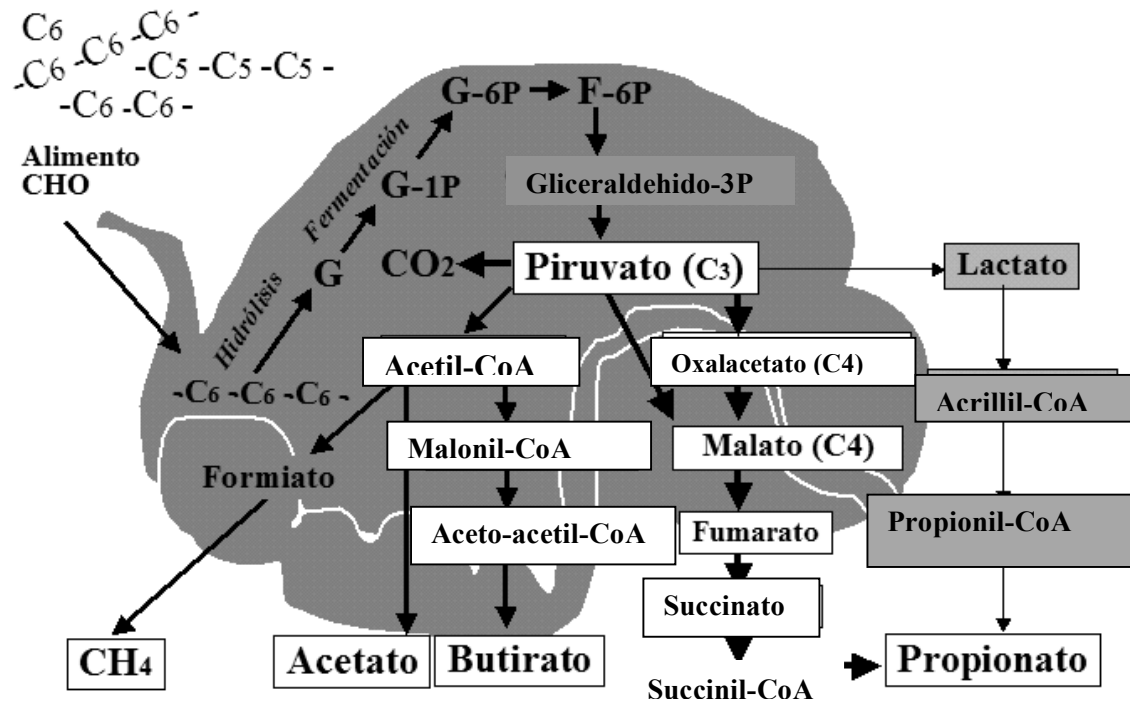
#### **2.3.4.1. Efectos de los ácidos orgánicos (malato)**

La mayoría de los estudios realizados para evaluar los efectos de los ácidos orgánicos *in vivo* se centran en la utilización de ácido málico y sus sales (malato sódico y cálcico). El malato es la sal de un ácido dicarboxílico presente en la naturaleza como intermediario del ciclo de Krebs. Se encuentra habitualmente en los forrajes, con mayores concentraciones en las leguminosas (alfalfa, 2,4-7,5%) que en gramíneas (heno de bermuda, 1,9-4,5%), disminuyendo dichas concentraciones al madurar las plantas (Callaway et al., 1997).

La adición de malato a las raciones puede ser necesaria para asegurar concentraciones adecuadas del mismo en el rumen y su inclusión como aditivo es actualmente factible gracias a la industria química (Salama et al., 2002; Caja et al., 2003) y puede ser adicionado como ácido libre o como sal (i.e. malato sódico y malato cálcico). La incorporación de variedades de forraje ricas en malato puede constituir la forma más económica de incluirlo en las raciones, ya que la inclusión del malato como aditivo no es económicamente factible (Callaway et al., 1997;

Salama et al., 2002). Sin embargo en Japón, la utilización de fumarato es económicamente viable (Asanuma et al., 1999).

**Figura 6.** Esquema de la formación y metabolismo de los ácidos grasos volátiles en el rumen



Fuente: Caja et al. (2003)

### 2.3.4.1.1. Estudios *in vitro*

Los resultados de los experimentos realizados *in vitro* (Tabla 6) indican que el malato induce a cambios en la fermentación ruminal, aumentando la proporción molar de propiónico. Los ácidos orgánicos malato o fumarato son precursores de la síntesis de propionato a través de un doble mecanismo: 1) Estimulan la captación y transformación del ácido láctico a propiónico por medio de la bacteria *S. ruminantium* (Asanuma et al., 1999; Carro et al., 1999; López et al., 1999; Carro y Ranilla, 2003; Ranilla y Carro, 2003); y 2) esta bacteria puede transformar dichos ácidos en succínico y propiónico (Nisbet y Martin, 1990). Si el animal hospedador puede absorber una mayor cantidad de ácido propiónico, dispondrá de una mayor cantidad de glucosa y por lo tanto de energía.

Martin y Streeter (1995), observaron que la adición de malato disminuyó la producción de lactato (4-8%), incrementó el pH (1-3%) del líquido ruminal y aumentó las concentraciones de AGV totales (4-33%). Carro y Ranilla (2003) evaluaron 4 concentraciones de malato (0, 4, 7 y 10 mM) en líquido ruminal de ovinos alimentados con heno de alfalfa, encontrando un efecto benéfico en la fermentación ruminal de cereales (maíz, cebada, trigo y sorgo) y una disminución lineal de la concentración de lactato, con incrementos lineales en las concentraciones de AGV totales, acético, propiónico y butírico, y en el pH final. La producción de CH<sub>4</sub> disminuyó para el trigo (9,1%), sorgo (9,1%) y cebada (2,9%), pero no para el maíz. Resultados similares fueron obtenidos por Mohammed et al. (2004) al evaluar diferentes concentraciones de malato (0, 5, 10 y 20 mM), utilizando maíz como sustrato de fermentación.

Nisbet y Martin (1991) observaron que la adición de malato y fumarato hasta alcanzar concentraciones de 10 mM duplica el crecimiento de *S. ruminantium*. Esta bacteria es útil en la captación y utilización del lactato, evitando su concentración en el rumen, lo cual, unido a la producción de CO<sub>2</sub>, contribuye a aumentar el pH (Stewart y Bryant, 1988; Martin et al., 1999). El CO<sub>2</sub> es un producto final de la fermentación del lactato a propionato por la vía del succinato-propionato, que es utilizada por *S. ruminantium* (Callaway y Martin, 1996). Otra característica de esta bacteria es que muchas de sus subespecies pueden utilizar ácido láctico como fuente de energía. Nisbet y Martin (1990) observaron que tanto el malato como el fumarato aumentan la captación (4 veces) y utilización (10 veces) del ácido láctico por *S. ruminantium*. Los mismos autores estimularon el consumo de lactato por *S. ruminantium*, al utilizar concentraciones de 25 y 100 mM de sodio (Na<sup>+</sup>) y 10 mM de L-malato, observando, en cambio, que el consumo de lactato fue bajo con las mismas concentraciones de Na<sup>+</sup> pero sin malato.

Si bien al aplicar malato suele aumentar la cantidad de ácido propiónico producido, se observa mucha variabilidad en los resultados relativos a otros AGV, que puede ser debida en parte a la dieta y a las condiciones experimentales. Carro y Ranilla (2003) y Gómez et al. (2004), señalan que el tipo de sustrato incubado podría determinar en gran medida los efectos de los ácidos orgánicos sobre la fermentación ruminal.

**Tabla 6.** Efectos de la suplementación con malato en estudios *in vitro*.

Incubación (horas, temperatura)	Concentración	Efectos									Autor (año)	
		pH	Total AGV	Acetato	Propionato	Butirato	Lactato	CH <sub>4</sub>	NH <sub>3</sub> -N	Digestibilidad		
24 h, 39 °C	0; 4; 8;12 (mM)	↑	↑		↑							Martin y Streeter (1995)
24 h, 39 °C	0; 4; 8;12 (mM)	↑			↑	NS	↑					Callaway y Martin (1996)
Rusitec	0; 5,62 (mmol)	NS	↑	NS	↑	NS	↓	↑	NS	↑ hemicelulosa		Carro et al. (1999)
24 h, 39 °C	2,25; 3,25 (g/L)	↓	↑	↑	↑	↓	↑					Martin (2000)
72 h, 39 °C	0; 8 (mM)	↑	NS	NS	↑	NS	NS	NS	↑	NS		Jalc y Ceresnakova (2002)
17 h, 39 °C	0; 4, 7; 10 (mM)	↑	↑		↑	↑	↓					Carro y Ranilla (2003)
Rusitec	0; 6,65 (mM)	NS	↑	NS	↑	↑		NS		↑ MS, FND,		Gómez et al. (2004)
48 h, 39 °C	0; 4; 8; 12 (mM)	NS	NS	NS	↑	NS		NS	NS	NS		Martin (2004)
6 h, 38 °C	0; 10; 20 (mM)	↑	↑	NS	↑			↓	NS			Mohammed et al. (2004)
17 h, 39 °C	0; 4; 8 (mM)	↑	↑				NS	NS				Tejido et al. (2005)
Continuo	0; 50; 100 (g/h/d)	NS	NS	↓	NS	NS	↓	NS	NS	NS MS, PB ↑ FND, FAD		Sniffen et al. (2006)

Abreviaturas: AGV, ácidos grasos volátiles; CH<sub>4</sub>, metano; NH<sub>3</sub>-N, nitrógeno amoniacal; ↑, aumento; ↓, reducción; NS, no significativo; MS, materia seca; PB, proteína bruta; FAD, fibra ácido detergente; FND, fibra neutro detergente

### 2.3.4.1.2. Estudios en condiciones *in vivo*

Aunque los estudios *in vitro* han demostrado efectos positivos del malato en la fermentación ruminal, el número de estudios *in vivo* publicados sobre los efectos del malato en rumiantes (Tablas 7, 8 y 9) es limitado.

Kung et al. (1982), en un experimento con vacas lecheras que recibieron ensilado de maíz *ad libitum* y diferentes dosis de ácido málico (0, 70, 105 y 140 g/d), no observaron ningún efecto en el pH ruminal (6,9-7,1) dos horas después de la administración de alimento. En el mismo estudio, observaron que la eficiencia de conversión del alimento (kg de leche producida/kg de alimento) fue un 8% mayor en animales que recibían la dosis más alta de ácido málico. Sin embargo, Salama et al. (2002), que evaluaron los efectos de la suplementación con malato (3,2 g/kg de MS) en cabras lecheras, no observaron diferencias entre tratamientos en la producción y composición de la leche durante toda la lactación. La falta de respuesta se atribuyó a un nivel elevado de malato, debido a que se utilizó alfalfa, rica en malato, como ración base.

Martin et al. (1999), observaron aumentos del pH como consecuencia de la administración de malato, en una prueba realizada con 4 terneros (485 kg PV) canulados en el rumen que recibieron una ración con 80% de grano aplastado (75% maíz: 25% trigo) dos veces al día (2,0% del PV). Se les suministró malato (0, 27, 54, 80 g/d) vía cánula ruminal, obteniendo un aumento lineal del pH ruminal en los animales con la dosis más alta de malato (6.2) comparado con el control (5.8). El malato tendió a aumentar linealmente la concentración de acetato (51,3–53,7 mM), y disminuyó linealmente los AGV (157,9–147,7 mM).



**Tabla 7.** Efectos de la suplementación con malato en vacas y cabras lecheras

Animal - n	Tratamiento	Efectos						Autor (año)
		Ingestión de MS	Producción de Leche	pH ruminal	AGV	NH <sub>3</sub> -N	Digestibilidad	
Vacas - 32	0; 70; 105; 140 (g/d)	NS	↑	NS	NS	NS		Kung et al. (1982)
Vacas -16	0; 70; 105; 140 (g/d)	NS	NS		↑ total, A, B			Kung et al. (1982)
Vacas - 40	0; 84 (g/d)	↑	↑	NS				Devant y Bach (2004)
Vacas - 40	0; 50 (g/d)		↑				NS MS, PB, FND, FAD	Sniffen et al. (2006)
Vacas - 4	0; 10; 20 (g/d)	NS	NS	NS	NS	NS		Khampa et al. (2006)
Cabras - 24	0; 0,32 (%)	NS	NS					Salama et al. (2002)

Abreviaturas: AGV, ácidos grasos volátiles; NH<sub>3</sub>-N, nitrógeno amoniacal; ↑, aumento; ↓, reducción; NS, no significativo; MS, materia seca; PB, proteína bruta; FAD, fibra ácido detergente; FND, fibra neutro detergente; A, acético; P, propiónico.

Montaño et al. (1999), en otro experimento con terneros canulados en el rumen, alimentados dos veces al día (2% PV) con una ración con 77% de copos de cebada suplementada con ácido málico (80 g/d), observaron que el descenso del pH ruminal producido a las dos o tres horas tras la oferta de la comida era menos acusado cuando los animales recibían malato.

Las diferencias de resultados pueden deberse a las características de las raciones ingeridas por los animales. Las respuestas más positivas en el pH ruminal se han observado cuando las raciones contenían altas proporciones de cereales y con bajos valores de pH ruminal. El malato podría controlar el fuerte descenso del pH ruminal que se produce tras la ingestión de raciones ricas en carbohidratos rápidamente fermentecibles (Caja et al., 2003).

Martin et al. (1999) realizaron 3 experimentos con terneros en cebo intensivo. En el primero se observó que la adición de malato (40 y 80 g/d) aumentó linealmente la ganancia de peso (+11,4%) y la eficiencia alimenticia (+8,4%). Los terneros que recibieron una dosis de 80 g/d presentaron una ganancia media de peso de 2,1 kg/d, frente a 1,9 kg/d para la dosis de 40 g, y 1,9 kg/d para el control. La dosis de 80 g/d tuvo un pequeño aumento en la ingestión (+0,5 kg MS/d). Sin embargo, la dosis de 40 g/d redujo la ingestión (-0,4 kg MS/d) con relación al control. El índice de conversión (IC) fue de 5,4 para los terneros que recibieron malato, contra 5,8 del grupo control. En el segundo experimento se administró malato a dosis de 0, 60 y 120 g/d. En el periodo de transición (primeros 10 días) se observó que los terneros que recibieron malato presentaron una mayor ganancia de peso (2,9; 3,4 y 3,7 kg/d, para los niveles de 0, 60 y 120 g/d de malato, respectivamente), sin que se observaran diferencias en la ingestión. Sin embargo, en los 52 días restantes de la prueba no se observaron mejoras en ninguno de los parámetros estudiados. En base a estos resultados los autores sugirieron que podría ser más conveniente utilizar malato durante la fase de transición (entre la cría y el cebo), que se da cuando los animales llegan a los cebaderos y suele coincidir con un periodo de estrés. En la tercera prueba los terneros recibieron malato a dos dosis (0 y 100 g/d) sin que se observaran diferencias entre tratamientos.

Los primeros resultados publicados sobre utilización de malato en corderos de engorde (Garín et al., 2001) indicaron una mejora del IC en corderos (13 kg PV) de raza Ripollésa alimentados con pienso basado en cereales (58%) y al que se

adicionó una mezcla de levaduras y malato sódico a 3 niveles (0, 0,2 y 0,3%). Los autores observaron que los corderos que recibieron el concentrado con malato mejoraron el IC en un 8%, con una menor ingestión de pienso (12,4%). Sin embargo, el aumento diario de peso (260 g/d) no varió entre tratamientos. La respuesta en el IC y en la ingestión de pienso fue más elevada a la dosis de 0,2%.

Por el contrario, Cuesta et al. (2003) no encontraron efecto alguno en la IMS, el IC, ni el peso canal de corderos de raza Merina alimentados con pienso (50% cebada: 30% maíz) y paja *ad libitum*, añadiendo o no malato (0,4%) al pienso. Los resultados obtenidos indican que los corderos que recibieron malato consumieron alrededor de un 9% más de pienso que los del control. El consumo de paja fue similar en ambos y la GMD de peso fue de 292 g/d para control y de 308 g/d para el tratamiento que recibió malato. Flores (2004), con corderos de cebo razas Manchega y Lacaune, utilizó una dosis del 0,2% de malato adicionado a dos tipos de pienso basados en cebada (66%) y maíz (60%). La adición de malato disminuyó la ingestión de pienso en los corderos que recibieron maíz (-8%). La GMD también fue mejorada con el malato, siendo en este caso mayor (+22%) en el grupo que consumió pienso a base de cebada. En consecuencia, el IC en los piensos con malato fue mas bajo (-12% y -24% para los corderos que consumieron piensos a base de maíz y de cebada, respectivamente).

En los escasos trabajos realizados *in vivo* con corderos, los resultados no son concluyentes (Tabla 8). En algunos casos se observan incrementos en la GDP y reducciones en el IC (Garín et al., 2001; Flores et al., 2004). En otros, sin embargo, no se observa efecto alguno sobre estos parámetros productivos (Cuesta et al., 2003; Carro et al., 2006). Castillo et al. (2004) sugirió que factores dietéticos tales como la relación forraje:concentrado y el tipo de forraje son importantes en la determinación de la respuesta de la suplementación con malato, porque el contenido del ácido málico en la dieta base puede variar. Las respuestas inconsistentes pueden tener relación con las condiciones experimentales, como el tipo de ración base y la dosis de malato. En cualquier caso el malato se perfila como un aditivo potencial en la alimentación de rumiantes, aunque es difícil predecir sus efectos en cada caso. Los conocimientos de su benéfica acción sobre los parámetros productivos constituyen un importante avance en busca de alternativas que permitan sustituir los antibióticos promotores del crecimiento (Caja et al., 2003).

**Tabla 8.** Efectos de la suplementación con malato en bovinos

Animal-n	Tratamiento	Efectos							Autor (año)
		Ingestión MS	Ganancia media diaria	Índice de conversión	pH ruminal	AGV	NH <sub>3</sub> -N	Digestibilidad	
Terneros-6	0; 100; 200 (mg/kg PV)	NS				□ total, ↑P, NS A, B	NS	NS MS, FND, PB	Kung et al. (1982)
Terneros-4	0; 200 (mg/kg PV)					NS total, A, P, B			Kung et al. (1982)
Terneros-4	0; 27; 57; 80 (g/d)				↑	NS	NS		Martin et al. (1999)
Terneros-11	0; 40; 80 (g)	NS	↑	NS					Martin et al. (1999)
Terneros-9	0; 60; 120 (g/d)	NS	□10d NS	□10d. 52 d NS					Martin et al. (1999)
Terneros-24	0; 100 (g/d)	NS	NS	NS					Martin et al. (1999)
Terneros-4	0; 80 (g)				↑	NS		NS	Montaño et al. (1999)
Novillas-4	41,7 (mg/L)	↓			NS	NS	NS		Cardozo et al. (2006)
Terneros-38 (209 kg PV)	0; 4 (g/kg MS)	NS	NS	NS					Castillo et al. (2007)
Terneros-38 (416 kg PV)	0; 4 (g/kg MS)	NS	NS	NS					Castillo et al. (2007)
Terneros-4	0; 2,5; 5; 7,5 (g/kg MS)	↓			NS	NS	NS		Foley et al. (2007)

Abreviaturas: AGV, ácidos grasos volátiles; NH<sub>3</sub>-N, nitrógeno amoniacal; ↑, aumento; ↓, reducción; NS, no significativo; MS, materia seca; PB, proteína bruta; FAD, fibra ácido detergente; FND, fibra neutro detergente; A, acético; B, butírico; P, propiónico.

**Tabla 9.** Efectos de la suplementación con malato en ovinos.

Animal- n	Tratamiento	Efectos							Autor (año)
		Ingestión MS	Ganancia media diaria	Índice de conversión	pH ruminal	AGV	NH <sub>3</sub> -N	Digestibilidad	
Corderos-108	0; 0,2; 0,3 (%)	↓	↑	↓	NS				Garín et al. (2001)
Corderos-16	0; 0,4 (%)	NS	NS	NS				NS	Cuesta et al. (2003)
Corderos-64	0; 0,2 (%)	↓	↑	↓	↑				Flores (2004)
Corderos-8	0; 0,2 (%)	↓	NS	↓				↑ MS, CP, FND, FAD, EB	Flores (2004)
Corderos-24	0; 0,4; 0,8 (%)	NS	NS	NS	NS	NS, ↑ B	NS	NS	Carro et al. (2006)
Carneros-3 (Castrados)	0; 151; 302 (g/L)				NS	NS	NS	NS: MS, FND, FAD	Quarti et al. (2006)

Abreviaturas: AGV, ácidos grasos volátiles; NH<sub>3</sub>-N, nitrógeno amoniacal; ↑, aumento; ↓, reducción; NS, no significativo; MS, materia seca; PB, proteína bruta; FAD, fibra ácido detergente; FND, fibra neutro detergente; B, butírico.

## 2.4. Referencias bibliográficas

- Acedo-Rico, J., 1998. Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: Minerales forma orgánica, levaduras, Enzimas, Ionóforos y Otros. XIV Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. (Ed). P.G<sup>a</sup>. Rebollar, C. de Blas y G. G. Mateos). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España, pp. 47–66.
- Adebowde, E.A., 1981. The Maize replacement value of fermented cassava peels (*Manihot utilissima* pohl) in rations for sheep. *Trop. Anim. Prod.* 6-1, 54–59.
- Asanuma, N., Iwamoto, N., Tsuneo, H., 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* 82, 780–787.
- Bach Knudsen K.E., 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67, 319–338.
- Bacha, F., 2002. Nutrición, Patología digestiva y salud intestinal de rumiantes en cebo; aspectos prácticos. En: XVIII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición Y Alimentación Animal. (Ed). Rebollar, P. Ga.; de Blas, C. y Mateos, G.G.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, pp. 141–159.
- Beauchemin, K.A., Rode, L.M., Sewalt, J.H., 1995. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rat of steers fed dry (short communication). *Can. J. Anim. Sci.* 75, 641–644.
- Bergman, E.N., 1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews.* 2, 567–589.
- Beuchat, L.R., Golden, D.A., 1989. Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technol.* 1, 134–142.
- Bouattour, A.M., 2007. Effects of feeding different vegetal fat sources to increase conjugated linoleic acid in milk of small ruminants and interaction with fibrolilytic enzymes. Tesis doctoral. Department de Ciència Animal i del Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 198 pp.
- Britton, R.A., Stock, R.A., 1986. Acidosis, rate of starch digestion and intake. En: Oklahoma State University (Ed). Feed intake by Beef Cattle. MP 121. Proceedings of a Symposium, Animal Science Department, Agricultural Experimental Station, Oklahoma, pp. 125–136.

- Brockman, R.P., 1993. Glucose and short fatty acid metabolism. En: J.M. Forbes y J. France, (Ed) Quantitative Aspect of Ruminant Digestion and Metabolism. CAB International, New York, pp. 249–265.
- Burnet, G.S., Hanna J., 1963. Effect of dietary calcium lactate and lactic acid on faecal *Escherichia coli* counts in pigs. *Nature* 79, 815.
- Busquet, M., Greathead, H., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2003. Efecto del extracto de ajo y/o el cinamaldehído sobre la producción, composición y residuos en leche en vacas de alta producción. *ITEA 24 (Vol Extra)*, 756–758.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2005. Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 88, 2508–2516.
- Caja, G., Garín D., Mesia, J. 2000. Stimulating rumen fermentation: Organic acid salts as growth promoters. *Feed Int.*, 25, 23–25.
- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M.D., Albanell, E., 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos (I). *Producción Animal.* 193, 2–8.
- Caldwell, D.R., Bryant, M.P., 1996. Medium without rumen fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microbiol.* 14: 794–801.
- Callaway, T.R., Martin S.A., 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* 74, 1982–1989.
- Callaway, T.R., Martin, S.A., Wampler J.L., Hill, N.S., Hill G.M., 1997. Malate content of forage varieties commonly fed to cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 1651–1655.
- Calsamiglia, S., Ferret, A., 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. En: XVIII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. (Ed). Rebollar, P. Ga.; de Blas, C. y Mateos, G.G.). Fundación Española para el desarrollo de la Nutrición Animal, Madrid, pp. 97–115.
- Calsamiglia, S., Castillejos, L., Busquet, M., 2006. Alternatives to antimicrobial growth promoters in cattle. In *Recent Advances in Animal Nutrition*. P.C. Garnsworthy, and J. Wiseman, (Ed). Nottingham University Press, Nottingham, pp. 129–167.

- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2005. Screening for the effects of natural plant extracts on rumen microbial fermentation in high-concentrate diet and two level of pH in vitro. *J. Anim. Sci.* 83:2572–2579.
- Carro, M.D., Lopez,S., Valdes, C., Ovejero, F.J., 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen smulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed. Sci. Technol.* 79, 279–288.
- Carro M.D., Ranilla M. J. 2003. Effect of addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *Br. J. Nutr.* 89: 181–188.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84, 405–410.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J., 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 101–116.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Pereira, V., Vázquez, P., López Alonso, M., Méndez, J., Hernández, J., 2007. Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull calves: Influence of chemical form on blood acid–base balance and productive performance, *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 222–235.
- Chalupa, W., 1988. Manipulation of rumen fermentation. Recent developments in ruminant nutrition 2, 1-18. Haresign, H., and D. J. A. Cole, (Ed). Butterworth. pp. 308–322.
- Chesson, A., 1994. Manipulation of fibre degradation: An old theme revised. In: T. P. Lyons and R. A. Jacques (Ed) *Biotechnonology in the Feed Industry. Proceeding Alltech's 10th Annu. Symp.*, Nottingham University Press, Loughborough, pp. 83–98.
- Chesson, A., Forsberg, C.W., 1997. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. En: Hobson, P. and Stewart, C. (Ed) *The Rumen Microbial Ecosystem*, 2nd (Ed) Chapman & Hall Ltd, Andover, UK, pp. 229–381
- Church, D.C., 1993. *El Rumiente, Fisiología y Digestiva y Nutrición*. Editorial Acribia. Zaragoza, 641 pp.
- Cuesta, A., Ranilla, M.J., Giradles, F.J., Mantecón A.R., Carro, M.D., 2003. Efecto de la inclusión de malato en el pienso de corderos en cebo, sobre la



- ingestión, la digestibilidad y el rendimiento productivo. ITEA Prod. Animal. 24(vol. Extra), 762–764.
- Dahlen, C.R., DiLorenzo, N., DiCostanzo, A., Lamb, G.C., Smith, L.J., 2004. Effects of feeding a polyclonal antibody preparation against *Streptococcus bovis* or *Fusobacterium necrophorum* on performance and carcass characteristics of feedlot steers. J. Anim. Sci. 82, (Suppl. 1), 270. (Abstr).
- Dawson, K.A., Allison, M.J., 1988. Digestive disorders and nutritional toxicity. In: P. N. Hobson (Ed). The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier, Barking, Essex, pp. 445–447
- de Blas, C., González, G., Argamentaria, A., 1987. Aditivos para piensos. En: Nutrición y alimentación del ganado (Eds. De Blas, C.; González, G. & Argamentaria, A.). Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 454 pp.
- Demeyer, D.I., Van Nevel, C.J., 1975. Methanogenesis, an integrated part of carbohydrate fermentation and its control. In Digestion and Metabolism in the Ruminant. I. W. McDonald and A. C. I. Warner, (Ed). University of New England Publishing Unit, Armidale, pp. 366–382
- Devant, M., Bach, A., 2004. Effect of malate supplementation on rumen fermentation and milk production in postpartum cows. J. Dairy Sci. 87 (Suppl. 1), 47.
- DiLorenzo, N., Dahlen, C.R., DiCostanzo, A., Lamb, G.C., 2005. Feedlot performance response by steers to oral doses of polyclonal antibody preparations against *Streptococcus bovis* or *Fusobacterium necrophorum*. J. Anim. Sci., 83 (Suppl. 1), 617 (Abstr).
- Domínguez-Bello, M.G., Escobar, A. 1997. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. Anim. Feed Sci. Tech. 69, 91–102.
- Edmonds, M.S., Izquierdo, O.A., Baker, D.H., 1985. Feed additive studies with newly weaned pigs: efficacy of supplemental cooper, antibiotics and organic acids. J. Anim Sci. 60, 462–462.
- Elam, C.J., 1976. Acidosis in feedlot cattle: Pratical observations. J. Anim. Sci. 43, 898-901.
- Enemark, J.M.D., Jorgensen, R.J., Enemark, P.S., 2002. Rumen acidosis with special emphasis on diagnostic aspects of subclinical acidosis: a review. Veterinarija Ir Zootechnika 20, 16–29.

- Erasmus, J.L., Smith, I., Muller, A., O'Hagan, D., 1999. Effects of lasalocid on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 1817–1823.
- European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* 10/18/2003:L268/29–L268/43.
- Faez, I., Marai, M., Owen, J.B., 1994. *Nuevas Técnicas de producción Ovina*. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 207–214.
- Fahey, G.C., Berger, L.L., 1993. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, D.C. (Ed). *El rumiante fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia, Zaragoza, pp. 305–337.
- FAO, 2007. Anuario estadístico de la FAO 2005–2006. [http://www.fao.org/statistics/yearbook/vol\\_1\\_1/index\\_es.asp](http://www.fao.org/statistics/yearbook/vol_1_1/index_es.asp). Consultado en: 08/05/07.
- FEDNA, 2003. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). C. de Blas, G. G. Mateos y P.Gª Rebollar (Eds.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, 423 pp. <http://www.etsia.upm.es/fedna/tablas.htm>. Consultado en: 03/03/07.
- Feng, P., Hunt, C.W., Julien W.E., Dickinson K., Moen T., 1992. Effect of enzyme additives on in situ and in vitro degradation of mature cool-season grass forage. *J Anim. Sci.* 70 (Suppl 1), 309.
- Flores, C., 2004. Improving the performance of sheep using fibrolytic enzymes in dairy ewes and malate in fattening lambs. Tesis doctoral. Department de Ciència Animal i dels Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, 106 pp.
- Foley, P., Callan, J., Kenny, D., Boland, T., O'Mara, F., 2007. Effect of level of dietary malic acid supplementation on rumen methanogenesis and fermentation in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 85 (Suppl. 1), 341 (Abstr).
- France, J., Siddons, R.C., 1993. Volatile fatty acids production. En: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. J. M. Forbes and J. France, ed. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K, pp. 107–121
- Garín, D., Caja, G., Mesia J., 2001. Effects of the use of Gustor XX® as a substitute of growth promoters in the intensive fattening of lambs. *Options Méditerranéennes, Cahiers* 54, 181–184.

- Giger-Reverdin, S., 1995. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55, 295–334.
- Gómez, J.A., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2004. Effects of disodium malate on microbial growth and rumen fermentation of two diets in Rusitec fermenters. *J. Anim. Feed Sci.* 13 (Supl. 1), 71–74.
- González, E., 2004. Use of fibrolytic enzymes in dairy goats. In vitro evaluation of activity and fermentative characteristics. Tesis doctoral. Department de Ciència Animal i del Aliments. Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 124 pp.
- Guilbot, A., C. Mercier. 1985. Starch. En: *The Polysaccharides*. Aspinall, O. (Ed). Academic Press. New York. 209 pp.
- Gustafson, R.H., Bowen, R.E. 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 83, 531–541.
- Hall, M.B., 2007. Rumen acidosis: carbohydrate feeding considerations [www.das.psu.edu/dairynutrition/documents/hall.pdf](http://www.das.psu.edu/dairynutrition/documents/hall.pdf). Consultado en: 03/13/07.
- Hatfield, R.D., 1989. Structural polysaccharides in forages and their degradability. *Agron. J.* 81, 39–46.
- Havenaa, R., Huis In't Veld J.H.S., 1992. En: *The lactic acid bacteria in health and disease*, vol. 1. B.J.B. Wood (Ed.), Elsevier, New York.
- Heinrichs, J. 2005. Rumen development in the dairy calf. *Advances in Dairy Technology.* 17, 179–187.
- Herrera-Saldaña, R.E., Huber, J. T., Poore, M. H., 1990. Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *J. Dairy Sci.* 73, 2386–2393.
- Hibbard, B., Peters, J.P., Chester, J.A., Robinson S.F., Kotarski W.J., Croom, Jr., Hagle, Jr. W.M., 1995. The effect of slaframine on salivary output and subacute and acute acidosis in growing beef steers. *J. Anim. Sci.* 73, 516–525.
- Holzer Z., Aharoni Y., Lubimov V. 1997. The feasibility of replacement of grain by tapioca in diets for growing-fattening cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 134–141.
- Hoover, W.H., 1978. Digestion and absorption in the hindgut of ruminants. *J. Anim. Sci.* 46, 1789–1799.
- HUBER, T.L., 1979. Physiological effects of acidosis on feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 43, 902–909.

- Hungate, R.E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, New York, pp. 84–85.
- Huntington, G.B. 1997. Starch utilization by ruminants: From basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75, 852–867.
- Jalc, D., Ceresnakova, Z., 2002. Effect of plant oils and malate on rumen fermentation in vitro. *Czech J. Anim. Sci.*, 47, 106–111.
- Joseleau, J.P, Cartier, N, Chambat G, Faik, A, Ruel K. 1992. Structural features and biological activity of xyloglucans from suspension-cultured plant cells. *Biochemie.* 74, 81–88.
- Jung, H.G., Allen M.S., 1995. Characteristics of plant cell wall affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73, 2774–2790.
- Jung, H.G., Ralph, J., 1990. Phenolic-Carbohydrate Complexes in plant cell walls and their effect on lignocellulose utilization. In: Akin D. E., Ljungdahl L. G., Wilson J. R., Harris P. J. (Eds.) *Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants.*, Elsevier Science Publishers, London, UK, pp. 173–182.
- Kalmokoff, M.L., Bartlett, F., Teather, R.M., 1996. Are ruminal bacteria armed with bacteriocins? Symposium: ruminal microbiology. *J. Dairy Sci.* 79, 2297–2306.
- Khampa., S., Wanapat, M., 2006 Supplementation of Urea Level and Malate in Concentrate Containing High Cassava Chip on Rumen Ecology and Milk Production in Lactating Cows. *Pakistan Journal of Nutrition* 5 (6), 530–535,
- Kimberling, V.C., 1988. Lactic Acidosis. En: *Jensen & Swift's Diseases of Sheep.* 3th Edition. (Ed) Lea & Febiger, (Ed). Washington Square, Philadelphia, pp. 141-144.
- Kleen, J.L., Hooijer, G.A., Rehage, J., Noordhuizen, J.P.T.M., 2003. Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J. Vet. Med.* 50, 406–414.
- Kotarski S. F., Wanisha, R.D., Thurn, K.K. 1992. Starch hydrolysis by the ruminal microflora. *J. Nut.* 122, 178–190.
- Krehbiel, C.R., Britton, R.A., Harmon, D.L., Wester, T.J., Stock, R.A., 1995. Effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. *J. Anim. Sci.* 73, 311–3121.
- Kung, L.Jr., Huber, J. T., Krummrey, J.D., Allison L., Cook, R.M., 1982. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.* 65, 1170–1174.

- Kung, L.Jr., Treacher R.J., Nauman G.A., Smagala A.M. Endres K.M., Cohen M.A., 2000. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83, 115–122.
- Lam, T.B., Liyama, K., Stone, B.A., 1990. Primary and Secondary walls of grasses and other forage plants: taxonomic and structural considerations. En: Akin D. E., Ljungdahl L. G., Wilson J. R., Harris P. J. (Ed). *Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants.* Elsevier Science Publihers, London, pp. 43–69.
- Lapierre, C., 1993. Application of new methods for investigation of lignin structure. En: Jung H. G., Buxton D. R., hatfield R. D., Ralph J. (Ed). *Forage cell wall structure and digestibility.* American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., Soil Science society of America, Inc., Madison, pp 133–166
- Lenhinger, A.L., 1985. *Short course in Biochemistry.* Worth publishers, Inc., NY.
- López, S., Valdes, C., Newbold, C.J., Wallace, R. J., 1999. Influence of sodium fumarate on rumen fermentation in vitro. *Br. J. Nutr.* 81, 59–64.
- López, S., Dijkstra, J., France, J. 2000. Prediction of energy supply in ruminants, with emphasis on forages: En: *Forage evaluation in ruminant nutrition* (Ed). Givens, D.I., Owen, E.; Axford, R. F. E. and Omed, H. M.). CAB International, Wallingford, Oxon, pp. 63–94.
- MacGregor, R.C., 1988. Growth Promoters and their importance in ruminants livestock production En: *Recent developments in ruminant nutrition.* Haresign, H. and D. J. A. Cole, (Ed). Butterworth. 2, 308–322.
- Mackie, R.I., Gilchrist, F.M.C., 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. *J. Agric. Sci.* 90, 241–254.
- Martin, S.A., Streeter, M.N., 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73, 2141–2145.
- Martin, S.A., 1998. Manipulation of Ruminal fermentation with Organic Acids: A Review. *J. Anim. Sci.* 76, 3123–3132.
- Martin, S.A., Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Hill, G.M., Williams, S.E., 1999. Effects of DL-Malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77, 1008–1015.

- Martin, S.A, Sullivan, H.M., Evans, J.D., 2000. Effect of Sugars and Malate on Ruminal Microorganisms. *J. Dairy Sci.* 83, 2574–2579.
- Martin, S.A., 2004. Effects of DL-Malate on In Vitro Forage Fiber Digestion by Mixed Ruminal Microorganisms. *Current microbiology*. Vol. 48, pp. 27–31.
- McDonald, P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., 1993. *Nutrition Animal*, 4<sup>a</sup> edición. (Ed). Acribia: Zaragoza, 555 pp.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., 2002. Carbohydrates 14-31. In: *Animal nutrition*, Sixth Ed. Pearson Education Limited, Harlow, 693 pp.
- McAllister, T.A., Dong, Y., Yanke, L.J., Bae, H.D., Cheng, K.J., 1993. Cereal grains digestion by selected strains of ruminal fungi. *Can. J. Microbiol.* 39, 367–376.
- McAllister, T.A., Okine, E. K., Mathison, G. W., Cheng. K.-J., 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76, 231–243.
- McAllister, T.A., Stanford, K., Bae, H.D., Treacher, R.J., Baah, J., Shelford J.A., Cheng, K.-J., 2000. Effect of a surfactant and exogenous enzymes on digestibility, growth performance and carcass traits of lambs. *Can. J. Anim. Sci.* 80, 35–44.
- Mohamed, Nour M.S., Abusamra M.T.; Hago, B.E.D., 1998. Experimentally induced lactic acidosis in Nubian goats: Clinical, biochemical and pathological investigations *Small Ruminant Research*, 31, 7–17.
- Mohammed, N., Lila, Z. A., Ajisaka, N., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., Itabashi, H., 2004. Inhibition of ruminal microbial methane production by  $\beta$ -cyclodextrin iodopropane, malate and their combination in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutri.* 88, 188–195.
- Montaño, M.F., Chai, W., Zinn-Ware, T. E., Zinn, R. A. 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J. Anim. Sci.* 77, 780–784.
- Monteils, V., Jurganz, S., Collin-Schoellen, O., Blanchart, G., Laurent, F., 2002. Kinetics of ruminal degradation of Wheat and potato starches in total mixed rations. *J. Anim. Sci* 80, 234–241.

- Morrison, W.R., Laignelet, B., 1983. An improved colorimetric procedure for determining apparent and total amilosa in cereal and other starches. *J. Cereal Sci.* 1, 9–20.
- Mould, F.L., Ørskov. E.R., 1984. Manipulation of ruminal fluid pH an diets influence on cellulolysis in sacco. Dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10, 1–14.
- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner, D.K., Rodwell, V.W., 1992. *Bioquímica de Harper* 2ª Ed. Mexico D. F.
- National Research Council. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. National Academy Press, Washington DC, 157p.
- Nielsen, B., 2001. Ácidos orgánicos en la producción animal. BASF. Mesa redonda. Lérida (Diciembre).
- Nisbet, D.J., Martin, S.A., 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69, 4628–4633.
- Nisbet, D.J., Martin, S.A., 1990. Effect of dicarboxylic acids and *Aspergillus oryzae* fermentation extrat on lactate uptake by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3515–3518.
- Nocek, J.E., 1997. Bovine acidosis: Implications on laminitis. *J. Dairy Sci.* 80, 1005–1028.
- Nocek, J.E., Tamminga, S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk and composition. *J. Dairy Sci.* 74, 3598.
- Nordlund, K., 2003. Factors that contribute to subacute ruminal acidosis. En: American Association of Bovine Practitioners. 36th Annual Conference, September 15-17. Columbus, OH. <http://www.vetmed.wisc.edu/>. Consultado en: 12/05/2005.
- Oetzel, G.R., 2003. Introduction to ruminal acidosis in dairy cattle. En: American Association of Bovine Practitioners. 36th Annual Conference, September 15-17, 2003. Columbus, OH. <http://www.vetmed.wisc.edu/>. Consultado en: 24/12/2004.
- Offiner, A., Bach, A., Sauvant, D., 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 91–93.

- Ørskov, E.R., 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.* 63, 1624–1633.
- Ørskov, E.R., 1992. *Protein Nutrition in Ruminants*. Academic Press Limited. London, pp. 24–28
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of potential degradation in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci. (Cambridge)*. 92, 499–503.
- Ørskov, E.R., Fraser, C., Kay, R.N.B., 1969. Dietary factors influencing the digestion of starch in the rumen and small and large intestine of early weaned lambs. *Br. J. Nutri.* 23, 217–226.
- Owens, F.N., 1988. Protein metabolism of ruminant animals. In: Church, D. C. (Ed). *The ruminant animal digestive physiology and nutrition*. Englewoog Cliffs: Prentice hall, pp. 227-249.
- Owens, F.N., Goetsch, A.L., 1988. Ruminal fermentation. In: *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*. D. C. Church (Ed). Waveland press, inc. Illinois, pp. 145–171.
- Owens, F.N., Secrist D.S., Hill, W. J., Gill, D.R., 1998. Acidosis in cattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76, 275–286.
- Owens, F.N.; Zinn, R., 1993. Metabolismo de la proteína en los rumiantes. En: CHURCH, C.D. (Ed). *El rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Acribia, Zaragoza, pp. 255–281.
- Pinos-Rodriguez, J.M., Gonzalez, S.S., Mendoza, G.D., Barcena, R., Cobos, M.A., Hernandez, A., Ortega, M. E., 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *J. Anim. Sci.* 80, 3016-3020.
- Philippeau, C., Martin, C., Michalet-Doreau, B., 1999. Influence of grain source on ruminal characteristics and rate site, and extent of digestion in beef steers. *J. Anim. Sci.*, 77, 1587–1596.
- Plaizier, J.C., Keunen, J.E., Walton, J.P., Duffield, T. F., McBride, B.W., 2001. Effect of subacute ruminal acidosis on in situ digestion of mixed hay in lactating dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 421–423.
- Ralp, J., Grabber, J.H., Hatfield, R.D., 1996. Lignin-ferulic cross-links in grasses: active incorporation of ferulate polysaccharide esters into ryegrass lignins. *Carbohydr. Res.* 275, 167–178.



- Ralphs, M.H., Provenza, F.D., Wiedmeier, R.D., Bunderson, F.B., 1995. Effects of energy source and food flavour on conditioned preferences in sheep. *J. Anim. Sci.* 73, 1651–1657.
- Ranilla, M.J., Carro, M.D., 2003. Efecto de la adición de fumarato y aspartato sobre la fermentación ruminal *in vitro* de grano de cereales. *ITEA Prod. Animal* 24(vol. extra):741–743.
- Richardson, L.F., Raun, A.P. Potter, E.L. Cooley, C.O., Rathmacher, R.P., 1976. Effect of monensin on rumen fermentation *in vitro* and *in vivo*. *J. Anim. Sci.* 43, 657–664.
- Rodriguez-Palenzuela, P., García, J., de Blas, C., 1998. Fibra soluble y su implicación en nutrition animal: enzimas y probióticos. XIV Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. (Ed). P.G<sup>a</sup>. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Barcelona, pp. 227-240.
- Rowe, J.B., Chot, M. Pethich, D.W., 1999. Processing cereal grains for animal feeding. *Australian journal of Agricultural Research.* 50, 721–736.
- Russell, J.B., Onodera, R., Hino, T., 1991. Ruminant protein fermentation: New perspectives on previous contradictions. In: T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima (Ed.) *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants.* Academic Press, London, pp.681–697.
- Russell, J. B., 2000. In: *Encyclopedia of Microbiology*, J. Lederberg *et al.*, 3 (Ed). (Academic Press, San Diego, CA.), vol. 4, p. 186.
- Russell, J.B., Rychlik, J.L., 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science* 292, 1119–1122.
- Salama, A.A.K., Caja, G., Garin, D., Albanell, E., Such, X., Casals, R., 2002. Effects of adding a mixture of malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on milk production of Murciano- Granadina dairy goats. *Anim. Res.* 51, 295–303.
- Santos, F.A.P., Huber, J.T., Theurer, C.B., 1998. Milk yield and composition of lactating cows fed steam-flaked sorghum and graded concentration of ruminal degradable proteins. *J. Dairy Sci.* 81, 215–220.
- Sauvant, D., Chapoutot, P., Archimède, H., 1994. La digestion des amidons para los ruminants et ses consecuencias. *Prod. Anim.* 7, 115–124.

- Sauvant, D., Meschy, F.; Mertens, D., 1999. Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. INRA Prod. Anim. 12, 49–60.
- Shu, Q., Gill, H.S., Hennessy, D.W., Leng, R.A., Bird, S.H., Rowe, J.B., 1999. Immunization against lactic acidosis in cattle. Res. Vet. Sci. 67, 65–71.
- Shu, Q., Hillard, M.A., Bindon, B.M., Duan, E., Xu, Y., Bird, S.H., Rowe, J.B., Oddy, V.H., 2000a. Effects of various adjuvants on efficacy of a vaccine against *Streptococcus bovis* and *Lactobacillus spp* in cattle. Am. J. Vet. Res., 61, 839–843.
- Shu, Q., Gill, H.S., Leng, R.A., Rowe, J.B., 2000b. Immunization with *Streptococcus bovis* vaccine administered by different routes against lactic acidosis in sheep. Vet. J. 159, 262–269.
- Slyter, L.L., 1976. Influence of acidosis on rumen function. J. Anim. Sci. 43, 910–929.
- Sniffen, C.J., 1980. The use of bypass protein in ration formulation. En: Proceedings 40th Semi-Annual Meeting of American Feed Manufacturers Association, Arlington, VA. pp. 40–44.
- Sniffen, C.J., Russell, J.B., Van Soest, P.J., 1983. The influence of carbon source and growth factors on rumen microbial growth. Proceedings of the Cornell nutrition conference for feed manufacturers, Cornell University, Ithaca, NY, pp. 26–33.
- Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Danna, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa, M., Martin, S.A., 2006. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. Anim. Feed Sci. Technol. 127, 13–31
- Stedman's. 2007. Stedman's online Medical Dictionary, 27<sup>th</sup> (Ed). <http://www.stedmans.com/section.cfm/45>. Consultado en 05/06/07
- Stewart, C.S., Bryant, M.P., 1988. The rumen bacteria. In: The rumen microbial ecosystem. (Ed). P. N. Hobson. Elsevier Applied Science. London and New York, pp. 21–75.
- Stone, W.S., 2004. Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminant Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. J. Dairy Sci. 87 (E. Suppl):E13–E26.

- Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Martin, S. A., Williams, S. E., 1994. Effect of malate on ruminal metabolism and performance of steers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl.1): 384 (Abstr.).
- Strobel, H.J., Russel, J.B., 1986. Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69, 2941–2947.
- Tejido, M.L., Ranilla, M.J., García-Martínez, R., Carro, M.D., 2005. In vitro microbial growth and rumen fermentation of different diets as affected by the addition of disodium malate. *Anim. Sci.* 81, 31–38.
- Theurer, C.B., 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 63, 1649.
- Theurer, C.B., Huber, J.T., Delgado, E., 1999. Invited review: Summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82, 1950–1959.
- Van Nevel, C.J., Demeyer D.I., 1988. En: *The rumen microbial ecosystem*. Hobson, P. N., (Ed). Elsevier Applied Science. London, pp. 387–443.
- Van Soest, P.J., 1982. *Nutrition ecology of the ruminants*. Corvalli: O & Books. 373 pp.
- Van Soest, P.J., 1994. *Nutrition ecology of the ruminants*. Cornell University Press, Ithaca, NY, 476 pp.
- Wallace, R.J., 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: Progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72, 2992–3003.
- Wallace, R.J., Cotta, M. A., 1988. Metabolism of nitrogen containing compounds. In: P. N. Hobson (Ed.). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier, Barking, Essex, UK, pp. 217–249.
- Wedekind, K.J., Muntifering, R. B., Barker, K.B., 1986. Effects of diet concentrate level and sodium bicarbonate on site and extent of forage fiber digestion in the gastrointestinal tract of wethers. *J. Anim. Sci.* 62, 1388.
- Weimer, P.J., 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76, 3114–3122.
- West, J.W., 2004. *Feed Additives for Dairy cattle*. Cooperative Extension Service. The University of Georgia College of Agriculture & Environmental Sciences. Disponible en: <http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/b988-w.htm>. Consultado en: 21/04/04.

- Williams, A.G., Coleman, G.S., 1988. The rumen protozoa. En: The Rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart (Ed). Blackie Academic and Professional, London, pp. 73-139.
- Williamson, G., Faulds, C. B., Kroom, P. A., 1998. Specificity of ferlic acid (ferloyl) esterases. *Biochemie*. 26, 205–209.
- Wolin, M.J., T. Miller, L., 1988. Microbe-microbe interactions. En: P. N. Hobson (Ed). The Rumen Microbial Ecosystem. Elsevier, Barking, Essex, UK, pp. 343–353.
- Yang, W.Z., Beauchemin, K.A., Rode, L.M., 2000. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cows diets. *J. Dairy Sci.* 83, 2512–2520.
- Yokoyama, M.T., Johnson, K.A. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: Church, D.C. (Ed). The ruminant animal digestive physiology and nutrition. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 125.
- Zeoula, L.M., Prado, I.N., Branco, A.F., 1999. Solubilidade e degradabilidade ruminal do amido de diferentes alimentos. *Rev. Bras. Zootec.* 28(5), 898–905.

CAPÍTULO 3:  
**Objetivos**

### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del estudio fue evaluar en corderos de cebo los efectos de la adición de malato a raciones basados en cereales o una mezcla de cereales y mandioca sobre los parámetros productivos y digestibilidad de los nutrientes, así como el efecto de la utilización de dosis crecientes de malato.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos fueron:

1. Evaluar los efectos del malato (Rumalato) en piensos basados en trigo o una mezcla de mandioca y cebada, en corderos en cebo intensivo, sobre:
  - Los parámetros productivos como son: consumo de pienso, ganancia de peso, índice de conversión, días al sacrificio y rendimiento en canal caliente.
  - Las características ruminales como son: pH del líquido ruminal al sacrificio, color de la mucosa, grosor del músculo, número de papilas ruminales por cm<sup>2</sup>, y longitud, anchura, área superficial y grado de queratinización de las papilas ruminales.
  - La digestibilidad de nutrientes, balance de energía y nitrógeno, y pH y consistencia de las heces.
2. Evaluar el efecto de diferentes niveles de inclusión de malato (Rumalato) en el pienso sobre:
  - Los parámetros productivos como son: consumo de pienso, ganancia de peso, índice de conversión, días al sacrificio y rendimiento en canal caliente.
  - El pH ruminal, nitrógeno amoniacal y la concentración y proporción de ácidos grasos volátiles en el rumen.

CAPÍTULO 4:

**Effect of malate and starch source on growth performance, ruminal traits,  
digestibility and nutrient balance of fattening lambs**

**ABSTRACT:** two experiments (1.1 and 1.2) were carried out to evaluate the main effects of malate (Rumalato<sup>®</sup>, 160 g/kg disodium malate and 840 g/kg calcium malate) and starch source in the concentrate of fattening lambs on growth performance, ruminal traits, digestibility and nutrient balance. In the first experiment (1.1), 73 Ripollesa breed lambs (7 wk of age) were fed *ad libitum* with pelleted concentrates and barley straw, and used in a 2 × 2 factorial arrangement to evaluate effects on growth performance and ruminal traits at slaughter. Four types of concentrate were prepared according to malate addition (0 vs. 2 g/kg) and starch source (wheat vs. a mixture of manioc and barley). Treatments were: **W** (wheat without malate), **W+M** (wheat with malate), **MNB** (manioc-barley without malate) and **MNB+M** (manioc-barley with malate). Feeding malate increased ( $P < 0.05$ ) concentrate intake and average daily gain (ADG) but did not affect feed conversion ratio (FCR), days at slaughter, weight and carcass yield, ruminal pH, and histomorphometric characteristics of ruminal papillae. Lambs fed wheat showed higher ( $P < 0.05$ ) intakes of concentrate dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), gross energy (GE) and malate, as well as ruminal papillae denseness ( $P < 0.001$ ) and keratin ( $P < 0.02$ ) than lambs fed manioc and barley, while a higher rumen papillae width (PW) was observed in lambs that consumed manioc-barley ( $P < 0.02$ ) than in lambs fed wheat. Interactions ( $P < 0.05$ ) between malate and source of starch were found for intakes of concentrate DM, OM and CP, days at slaughter for 23 kg, ADG, ruminal papillae surface area ratio, PW and rumen wall thickness. In general, the higher effects of feeding malate were observed in wheat diets. The appearance of the rumen epithelium colour was grey in wheat diets and darker for those of manioc-barley ( $P < 0.001$ ). In the second experiment (1.2), 8 individualized male Manchega lambs, under the same treatments than in exp. 1, were used in a double 4 × 4 Latin square design to evaluate nutrient digestibility and energy and nitrogen (N) balance. Malate did not affect ( $P > 0.05$ ) total DMI, although increased intakes of acid detergent fiber and malate ( $P < 0.01$ ). Malate addition decreased digestibility of DM, OM and acid detergent fiber ( $P < 0.02$ ). Compared to lambs fed manioc and barley, lambs fed wheat had higher ( $P < 0.01$ ) intakes of CP and malate, and tended to have higher ( $P < 0.07$ ) intakes of barley straw, lower ( $P < 0.03$ ) faecal pH and consistency, and lower ( $P < 0.03$ ) digestibility of DM and OM, and tendency to lower ( $P < 0.09$ ) digestibility of NDF and GE. Malate had no effect on energy and N balances. Lambs



fed manioc-barley excreted less ( $P < 0.02$ ) urinary and total N, and retained higher ( $P < 0.05$ ) percentage of N than those fed manioc and barley. As a consequence they had lower losses of urinary energy ( $P < 0.04$ ) and tended to have greater digestible and metabolizable energy ( $P < 0.09$ ). Interactions ( $P < 0.05$ ) between malate and source of starch in intakes (concentrate and total DM, OM, CP, starch, malate), N intake, faecal, digested, and retained were observed. These results indicate that malate (2 g/kg in concentrate) was useful for increasing ADG in wheat based diets, but did not provide additional benefits on feed efficiency, ruminal traits, digestibility and nutrient balance in intensively fattened lambs.

**Key words:** Fattening lambs, Malate, Starch, Manioc, Digestibility

---

Abbreviation: ADF, acid detergent fiber expressed exclusive of residual ash; ADG, average daily gain; BW, body weight; CP, crude protein; DM, dry matter; DMI, DM intake; EE, ether extract; FCR, feed conversion ratio; MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate MA, malic acid; ME, metabolizable energy; N, nitrogen; NDF, neutral detergent fiber; N, nitrogen OM, organic matter; PL, papillae length; PW, papillae width; PD; papillae denseness; RWT, rumen wall thickness; SAR, surface area ratio; SEM., standard error of the mean; W = wheat without malate, W+M = wheat with malate; VFA volatile fatty acids;

---

## 1. INTRODUCTION

Intensive lamb fattening systems require high concentrate diets to assure high productivity and fast growth. Cereal grains such as barley, wheat and corn, are the main sources of energy in european cattle feedlots (Bacha, 2002) and are frequently used in Spain for lambs intensively fattened lambs. However, because of the high cost and sometimes uncertain availability of these feedstuffs, producers search for alternatives, such as the partial replacement of cereal grains by manioc meal. Manioc meal contains high levels of readily fermentable energy (Wanapat, 2003) and can be used in ruminant diets. Several data show that all ruminant species can benefit from manioc feeding, with considerable reduction in production costs, and that associative effects of other feeds are important on the nature of response.

Excess of dietary readily-fermented starch or other rapidly fermented carbohydrates can result in ruminal acidosis (Krehbiel et al., 1995), causing reduced feed intake and nutrient absorption as well as depressed animal performance (Owens et al., 1998), and can damage ruminal epithelial tissues (Underwood, 1992).

Traditionally, most ionophores antibiotics have been used in ruminant diets in order to prevent or control ruminal acidosis, and to improve performance and health in beef and dairy cattle (Martin, 1998; McGuffey et al., 2001; Carro and Ranilla, 2002). However, the use of antibiotic supplements in ruminant diets was banned in the European Union in January 2006 (regulation 1831/2003/EU). For this reason, there is substantial attention and increased interest in evaluating the potential of organic acids (fumarate and malate) for substitution of the antibiotic growth promoters (European Commission, 1998; Martin, 1998; Caja et al., 2000).

Malate is found naturally in common forages fed to ruminants in variable concentrations, legumes being, in general, richer than grasses (Callaway et al., 1997). *In vitro* ruminal fermentation studies have shown that malate increased pH (Martin and Streeter, 1995; Carro and Ranilla, 2003), as well as digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), and neutral detergent fiber (NDF) (Carro et al., 1999). However, some of these studies (Carro and Ranilla, 2003) indicate that the effects of malate are affected by the composition of the incubated diet.

Experiments conducted to assess the effects of malate in dairy cows (Kung et al., 1982) and steers (Kung et al., 1982; Martin et al., 1999; Montaña et al., 1999) have not yielded consistent results. Similarly, in fattening lambs, Flores (2004) reported beneficial effects of the use of malate (2 g/kg in concentrate) on feed conversion ratio (FCR) and total tract digestibility, but the effects of malate were greater in barley than in corn based diets. Cuesta et al. (2003) reported no effects of malate supplementation (4 g/kg of diet, 50% barley and 30% corn) on concentrate intake and nutrient digestibility. These contrasting results indicate that dietary factors as the main energy or starch source may be important in determining the response to malate supplementation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of adding malate to concentrates containing different sources of starch (wheat or a mixture of manioc and barley) on productive performance and digestive traits of lambs under intensive fattening conditions.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Experiment 1. Growth performance and ruminal traits of growing lambs

#### 2.1.1. Animals, experimental diets and management

Experimental and animal care procedures were approved by the Ethical Committee on Human and Animal Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (Reference CEEAH 493).

A total of 73 (7-wk-old) Ripollesa lambs (male,  $n = 38$ ;  $14 \pm 0.28$  kg BW; and female,  $n = 35$ ;  $13.9 \pm 0.27$  kg BW) were used in a  $2 \times 2$  factorial design (malate  $\times$  starch source). Lambs were born in the flock of the S1GCE (Servei de Granges i Camps Experimentals) of the Universitat Autònoma de Barcelona in Bellaterra (Barcelona, Spain). When births were recorded, newborn lambs were weighed, their navel was disinfected (2% iodine solution in ethanol 96%), and they were tagged in the left ear (2-piece, flexible, plastic, tamper-resistant flaps, 4.1 g; and  $3.8 \times 3.5$  cm, Rumitag). In addition before weaning these lambs ( $\geq 10$  kg) were identified through an electronic identification (e-ID) system by means of oral administration of ceramic mini-boluses (51.0 mm o.d.  $\times$  10.5 mm length, weight 14.0 g, and specific gravity of 3.5) which contained 1 passive, half-duplex, glass encapsulated transponder ( $32 \times 3.8$  mm; model Ri-Trp-RR2B-06, Tiris, Almelo, the Netherlands) and were machine-sealed with a food-grade silicon paste (Rumitag). This bolus was retained in the reticulorumen throughout the life of the lamb (Garín et al., 2003).

Lambs suckled from their mothers overnight (1600 to 1000) and were creep-fed a commercial starter concentrate (OM, 940; CP, 175; ether extract, 49; cellulose, 47; g/kg as-fed; Raltec pelleted prestarter, Serveram, Vic, Spain) until weaning. Weaning occurred weekly. Ripollesa lambs were weaned when they weighed more than 12 kg of BW. After weaning, lambs were assigned by weight within sex to eight balanced groups and intensively fattened until they reached the slaughtering market weight as Spanish "Pascual" lambs (23 kg BW). The lamb groups were randomly assigned to experimental treatments, with two repetitions per treatment. Factors were addition or not of malate (Rumalato®, Norel & Nature Nutrition S. A., Madrid, Spain) and starch source (wheat or a mixture of manioc and barley). Therefore, the experimental

concentrates (Table 1) and treatments were: W (wheat without malate), W+M (wheat with malate), MNB (manioc-barley without malate) and MNB+M (manioc-barley with malate).

Concentrates were formulated to be isonitrogenous and isoenergetic and were designed to meet nutrient recommendations of a 20 kg lamb with an ADG of 300 g/d (NRC, 1985). All ingredients of the concentrates were ground through a 3 mm screen, mixed and pelleted to 5 mm diameter. Malate supplement, a stabilized and micronized commercial product composed in this case of 16 and 840 g/kg disodium malate and calcium malate, respectively, was topdressed (2 g/kg) on concentrate pellets of treatments W+M and MNB+M at the time of fabrication process. This level of malate was the same used in previous studies conducted by Garín et al. (2001) and Flores (2004) in the Universitat Autònoma de Barcelona.

During the experiment (42 d), the lambs were housed in straw-bedded pens (1.5 m<sup>2</sup>/lamb) equipped with a hopper for concentrate (2.0 m of width), a rack for straw (2.4 × 0.50 × 0.80 m) and an automatic drinker. They were fed *ad libitum* on experimental concentrate and barley straw, and had access always to fresh water. The animals were slaughtered (5 h fasted) at a commercial plant when they reached the slaughtering weight, and the carcass hot weight was recorded. Rumen of each lamb (identified by e-ID, with the help of a handheld transceiver) was collected and processed immediately after evisceration.

### 2.1.2. Measurements, calculations and analysis

The average daily intake of concentrate was calculated as the difference between the total amount of concentrate offered and refused from weekly feed intake records. Concentrate orts by lamb pen were removed and weighed weekly (precision 10 g) during the experiment. Lambs were individually weighed weekly throughout the experiment (precision 0.1 kg; Tru-Test AG 500 Series versions, Tru-Test incorporated, Texas, USA) before offering feed. The ADG for individual lambs was calculated as the regression of daily gain on time. The average FCR for each lamb was calculated as the ratio between average concentrate DMI and ADG.

Samples of all feeds used were collected every 2 weeks and stored at room temperature until chemical composition analysis. The samples of concentrate and barley straw were ground through a 1-mm stainless steel screen (P. Prat S.A.,

Sabadell, Spain) and were then analyzed for DM (24 h at 103 °C, ID number 950.02 AOAC, 1990) and ash (4 h at 550 °C, ID number 942.05; AOAC, 1990). The OM was calculated as the difference between DM and ash content. The CP was determined by the Kjeldahl procedure (ID number 984.13; AOAC, 1990) by using a Tecator S-263 01 (Höganäs, Sweden). Ether extract (EE) was determined by the Soxhlet method (ID number method 920.39; AOAC, 1990). Fiber fractionation was analyzed sequentially (Van Soest et al., 1991), using an Ankom Fiber Analyzer incubator (Ankom Technology, Fairport, NY). Acid detergent fiber (ADF) and neutral detergent fiber (NDF), the latter using a heat stable amylase, are expressed exclusive of residual ash. Gross energy (GE) content of feeds, was determined using an adiabatic bomb calorimeter (calorimeter C4000, Janke & Kunkel, IKA Analysentechnik, Heitersheim, Germany). Starch content was derived from FEDNA tables (de Blas et al., 1999). All analyses were performed in duplicate, and average values were used for calculations.

For malate determination, 0.5 g of ground feed samples were mixed with 12.5 mL of deionized water in a glass tube and were boiled in a 100 °C water bath for 30 min. The samples were then mixed using a glass-stirring rod to release organic acids from the cellular membranes. The slurry was filtered and the tube and the residue were rinsed with 12.5 mL of deionized water to remove MA residues. The filtrate was collected for the analysis of malate by High-Performance Liquid Chromatography (Waters 600E, Waters 486 UV absorption detector at 214 nm, D-2500 Merck-Hitachi integrator, 100- $\mu$ L loop; Waters HPLC system, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) at 35 °C using a Bio-Rad HPX-87H Aminex organic column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The samples were eluted from the column with 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup> and malate was expressed as the anion of malic acid.

Ruminal fluid was removed from each lamb at slaughtering. The ruminal fluid (50 ml) was strained through two layers of cheesecloth. The pH was determined immediately using a glass electrode portable pH-meter (model 507, Crison, Alella, Barcelona, Spain) equipped with an immersible probe (Cat. 52-00, Crison Instruments, S.A., Barcelona, Spain). A calibration using standard buffers of pH 4.0 and pH 7.0, respectively, was carried out on each collection before measuring began. A visual evaluation of the color of the ruminal mucosa was carried out, immediately

after evisceration, scoring 1 for brow, 2 for grey light brown, and 3 for dark (adapted from Cozzi et al., 2002).

Samples of ruminal wall tissue (approximately 10 × 5 cm) were cut from the two different sacs of the rumen (dorsal and ventral), washed with distillate water, and fixed in a 10% formaline solution. Samples were embedded in paraffin according to routine histological procedures, and sections were stained with hematoxylin-eosin (Kiernan, 1990). Two sections per sample were used.

Histological measurements were performed with a light microscope (Olympus series 218223 BHS, Barcelona, Spain) using an ocular micrometer at 20× (Olympus, ref. 209-35040, Microplanet, Barcelona, Spain). Papillae length (PL), papillae width (PW), rumen wall thickness (RWT) and papillae (tip, middle and base) keratin (PK) were measured in 10 (individual) well-oriented papillae from each histology slide and expressed as μm. Ten measurements of RWT were also taken from each histology slide. All histomorphometric analyses were done in a blinded fashion by the same person. The average of 10 measurements was treated as an experimental unit.

The papillae denseness (PD) for each sac expressed as number of papillae per cm<sup>2</sup>, was determined according to Flores (2004), using a stereoscopic light microscopy (Bausch & Lomb, model A5Z45E, Rochester, NY). The ruminal papillae were manually counted in a portion of 1-cm<sup>2</sup> of ruminal tissue, in duplicate.

Surface area of papillae per surface area of each ruminal section is presented as the surface area ratio (SAR) and was calculated using the procedure of Hill et al. (2005). Papillae were considered to be cylindrical in shape with one closed end. Measured width was assumed equal to the diameter of the papillae. Therefore, equation [1] was used to calculate the lateral area of papillae, based on the surface area of a cylinder plus the area of a circle; in addition, equation [2] was used to calculate the average SAR of each sac of the rumen by multiplying the average surface area of the papillae in each sac by the average denseness or number of papillae per unit area in that sac:

$$[1] \text{ Surface area of papillae (cm}^2\text{)} = 2 \times r \times \pi \times L + \pi \times r^2$$

where:

r = radius in cm

L = length in cm.

$$[2] \text{ SAR} = (\text{average surface area of papillae in sac X}) \\ \times (\text{average papillae denseness in sac X})$$

where:

X can be dorsal or ventral sac.

### 2.1.3. Statistical analysis

Weekly data for group concentrate DMI were analyzed using the PROC MIXED of SAS (v. 8.2, SAS Institute, Cary, Inc.) with repeated measures (Littel et al., 1998). The statistical model contained the fixed effects of treatment (malate addition and wheat or manioc-barley), week as the repeated factor and group as random effect, their interactions and the residual error. When an interaction effect was not significant it was deleted from the model. The statistical model for analysis was:

$$Y_{ijkl} = \mu + w_j + M_k + S_l + (M \times S)_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

where:

$Y_{ijkl}$  = observed value for concentrate DMI

$\mu$  = overall mean

$w_j$  = week effect ( $j = 1, 2, 3, 4, 5, 6$ )

$M_k$  = malate effect ( $k = \text{without malate, with malate}$ ).

$S_l$  = starch effect ( $l = \text{wheat, manioc-barley}$ )

$(M \times S)_{kl}$  = effect of the interaction between malate and starch source

$\varepsilon_{ijkl}$  = residual error

The covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion (SBC) was considered to be the most desirable analysis (Littel et al., 1998), and least square means for treatments are reported.

Data for ADG, concentrate conversion ratio, days at slaughter (actual and corrected for 23 kg BW), ruminal pH at slaughter, carcass weight and yield, color of ruminal mucosa, SAR, PL, PW, PD, PK and RWT, were analyzed using the general linear model (GLM) procedure of SAS (v. 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC). The model included the fixed effects of treatment (malate addition and wheat or manioc-barley), sex and the first order interaction of these effects and the residual error.

Whenever sex effect and an interaction between fixed effects were not significant it was taken out from the model. The statistical model used was:

$$Y_{ijkl} = \mu + Sx_i + M_j + S_k + (M \times Sx)_{ji} + (S \times Sx)_{ki} + (M \times S)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  = observed value

$\mu$  = overall mean

$Sx_i$  = sex effect (i = 1 and 2): 1= male and 2= female.

$M_j$  = malate effect (j = without malate, with malate).

$S_k$  = starch effect (k = wheat, manioc-barley)

$(M \times Sx)_{ij}$  = effect of the interaction between malate and sex

$(S \times Sx)_{ki}$  = effect of the interaction between of starch source and sex

$(M \times S)_{kl}$  = effect of the interaction between malate and starch source

$\varepsilon_{ijkl}$  = residual error

Differences between treatments were declared at  $P < 0.05$  and tendencies were discussed at  $P < 0.10$ .

## 2.2. Experiment 2. Digestibility and nutrient balance of growing lambs

### 2.2.1. Animals, treatments, and experimental procedures

As in experiment 1 (Exp.1), experimental and animal care procedures were approved by the Ethical Committee on Human and Animal Experimentation of the Universitat Autònoma de Barcelona (CEEAH, 493). Eight weaned Manchega male lambs with an average initial BW of  $13.24 \pm 0.14$  kg were used in this trial.

The experimental lambs were arranged according to a double  $4 \times 4$  Latin square design in order to measure the total tract digestibility, and determine the energy and N balance. The experiment consisted of 4 periods of 21 d (14 d for diet adaptation and 7 d for sample collection). Lambs were randomly assigned to one of the four experimental concentrates (W, W+M, MNB, MNB+M) used in Exp. 1. During the experiment, lambs were kept in individual metabolism cages ( $0.7 \times 1.5$  m, 1.90 m high), carefully cleaned and disinfected, equipped with two feeders (one for concentrate and another for straw), an automatic drinker and facilities of quantitative



collection of total faeces and urine separately. Diets including experimental concentrate and barley straw (coarsely chopped to approximately 5 cm in length) were offered *ad libitum* once daily (0800 h).

### **2.2.2. Measurements, sample collection and analysis**

During the adaptation and collection period, the quantity of concentrate and barley offered and refused was weighed (precision 10 g) daily to determine *ad libitum* feed intake. Feed levels were adjusted so that animals refused between 10 to 15% of feed offered. Feeders were cleaned and orts collected each morning (0800 h). Fresh feed was offered once daily (0830 h) and refusals were discarded. From d 1 through 3 of each experimental period, the new experimental diet was introduced progressively. Fresh water was available in the crates and its consumption was measured with direct reading of the graduated container connected to the automatic drinker. The average daily water consumed for individual lambs was calculated from weekly water consumed by drinking records and expressed as litres of daily consumption.

Lambs were individually weighed (precision 0.1 kg; Tru-Test AG 500 Series versions, Tru-Test incorporated, Texas, USA) weekly throughout the experiment before offering feed. The ADG for individual lambs was calculated using weekly measurements of body weight. The average FCR for each lamb was calculated as kg DMI/kg ADG.

During the collection period, daily faecal consistency was subjectively recorded on a four – point scale, where 4 = normal faecal consistency, 3 = soft, 2 = runny and 1 = diarrhoea (adapted from Larson et al., 1977, and Coverdale et al., 2004). The total faeces were collected and weighed, and a 10% aliquot was retained and composited for each lamb within each period. The faeces pH was measured immediately after collection using a portable pH-meter (model 507, Crison, Alella, Barcelona, Spain), equipped with an immersible probe (Cat. 52-00, Crison Instruments, S. A. Barcelona, Spain). A calibration using standard buffers of pH 4.0 and pH 7.0, respectively, was carried out on each collection before measuring began.

Each morning during the collection period, urine was collected into plastic bottles and urine volume recorded with 20 mL of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10% vol/vol) to maintain a pH below 3.0 and prevent any N losses. A 10% aliquot of urine was retained daily and composited for each lamb within each period.

Samples of the concentrates and barley straw were collected daily and composite biweekly throughout the experiment, and stored at room temperature for chemical composition analysis. Samples of faeces and urine were frozen ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) and orts were stored in cold chamber ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) until analysis. Faeces were dried in an air-forced oven at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 96 h and lamb hair and wool, concentrate and straw contamination were removed.

The samples of concentrates, barley straw, orts and faeces were ground and then analyzed for DM, OM, CP, NDF, ADF, GE and malate, as described in Exp. 1. Urinary N was determined with the Kjeldahl procedure previously described according to AOAC (1990). The formulas for the calculation of total tract digestibility were:  $(\text{nutrient consumed} - \text{nutrient in faeces}) / \text{nutrient consumed}$ . The digestible energy (DE) of the feed was calculated as its GE minus the corresponding energy content of the faeces. The metabolizable energy (ME) content of the diets was derived from measured faecal and urinary losses (Urine energy [kJ/g] =  $0.113 + 0.498 \text{ N [\%]}$ ) and estimated methane losses (Methane energy [%GE] =  $1.30 + 0.112 \text{ dEm} + \text{L} (2.37 - 0.05 \text{ dEm})$ ), where L = level of feeding (2.7), as a multiple of MJ of digestible energy for maintenance, and dEm = energy digestibility at maintenance =  $(\text{dE} + 0.107(\text{L} - 1)) / (1 + 0.113(\text{L} - 1))$ , with dE = measured energy digestibility at the L) (Blaxter et al., 1969).

The N balance was calculated by difference. All analyses were performed by duplicate, and average values were used for calculations.

### 2.2.3. Statistical analysis.

Data of lambs BW, DMI, ADG, FCR, digestibility (DM, OM, CP, NDF, and NDF), faecal pH and consistency, and nutrient balance (energy and nitrogen) were analyzed using the PROC GLM of SAS (SAS v. 8.2; Inst. Inc., Cary, NC) for a Latin square design with a  $2 \times 2$  factorial arrangement of treatments. The model accounted for the effect of malate addition, starch source, the interaction of malate  $\times$  starch, and period as fixed effects, and the residual error. Whenever period effect was not significant it was taken out from the model. The model was:

$$Y_{ijklm} = \mu + L_i + M_j + S_k + P_l + (M \times S)_{jk} + \varepsilon_{ijklm}$$

Where:

$Y_{ijklm}$  = dependent variable

$\mu$  = overall mean

$L_j$  = lamb effect

$M_j$  = *malate effect*

$S_k$  = starch effect

$P_l$  = period effect

$M \times S_{jk}$  = effect of the interaction between malate and starch source

$\varepsilon_{ijklm}$  = residual error.

Differences between treatments were declared at  $P < 0.05$  and tendencies were discussed at  $P < 0.10$ .

### **3. Results**

#### **3.1. Experiment 1**

##### **3.1.1. Chemical composition of feed**

The chemical composition of the experimental concentrates (Table 1) showed similar values for most of the analyzed nutrients except for CP and malate. The concentrates including manioc-barley were lower in CP (1.56 g/kg), than those containing wheat as a main starch source. As expected, concentrates containing malate showed, on average, a higher concentration of malate than unsupplemented concentrates (4.15 vs. 2.45 g/kg), but wheat based concentrates were richer in malate than manioc concentrates (3.8 vs. 2.8 g/kg).

Chemical composition (g/kg) of the barley straw was DM, 924; OM, 949; ash, 51; CP, 46; NDF, 787; ADF, 433; and GE, 2.89 MJ/kg DM, also showing an important level of malate content (16 g/kg DM).

##### **3.1.2. Nutrients intake**

The values of concentrate intake variables are shown in Table 2. Total concentrate DMI and intake of other nutrients (OM, CP, NDF, ADF, malate, and GE), except starch, were increased ( $P < 0.03$ ) by addition of malate to the concentrate.

The intakes of concentrate DM (762 vs. 722), OM (7110 vs. 662), CP (142 vs. 123), malate (3 vs. 2 g/d) and GE (12.66 vs. 11.94 MJ/d) were higher ( $P < 0.05$ ) when feeding wheat than manioc-barley based concentrates. However, starch source did not significantly affect NDF, ADF and starch intakes.

Interactions (malate  $\times$  starch) were observed ( $P < 0.03$ ) in concentrate DM, OM, CP, and ADF. No interactions (malate  $\times$  starch) were observed in NDF, starch and GE intakes.

### 3.1.3. Growth performance

The growth performance, weight and yield carcass variables are shown in Table 3. The initial ( $14.6 \pm 0.39$  kg) and final ( $23.8 \pm 0.42$  kg) BW of the animals were similar for all treatment groups. However, malate increased ADG (6%,  $P < 0.05$ ) of lambs, and malate  $\times$  starch interaction ( $P < 0.02$ ) was found for this parameter.

Mean FCR (concentrate) did not differ between the experimental groups and averaged 2.99, although numerically lower values were observed in lambs fed manioc-barley ( $P = 0.12$ ).

There was no significant effect of treatments on days at slaughter, which averaged 42 d and 37 d for actual and constant weight (23 kg), respectively, as well as on carcass weight ( $12.0 \pm 0.13$  kg) and yield ( $49.7 \pm 0.37$  %). However a malate  $\times$  starch interaction ( $P < 0.04$ ) was detected in days at slaughter for constant weight.

### 3.1.4. Ruminal pH, color and histomorphometric of ruminal epithelium

Ruminal pH at slaughter was not affected ( $P > 0.05$ ) by malate supplementation (Table 4) and was 6.43 as mean for all treatments.

The appearance of the rumen epithelium color varied noticeably between starch sources ( $P < 0.001$ ), but was not affected by malate. The ruminal mucosa was brown to grey (light grey) in lambs fed wheat based concentrates and grey to dark (darker grey) for those of manioc-barley (Table 4). Visual observation of the ruminal papillae

indicated no evidence of inflammation, hardened keratin or parakeratosis, or of any differences in shape, distribution, or length between treatments.

Means values of the SAR, PD, PL, PW, RWT and PK from the rumen epithelium of lambs are presented in Table 4. Lambs fed malate tended ( $P < 0.06$ ) to have increased PD ( $120/\text{cm}^2$ ) compared to control lambs ( $108/\text{cm}^2$ ). However, no differences attributed to malate addition were observed for SAR, PL, PW, RWT, and PK. Lambs fed wheat had more PD ( $P < 0.001$ ) and PK ( $P < 0.02$ ) than lambs fed manioc-barley. In contrast, lambs fed manioc-barley had increased PW ( $P < 0.03$ ) and showed numerically longer papillae ( $P < 0.12$ ) than wheat based concentrates.

A significant malate  $\times$  starch interaction ( $P < 0.05$ ) was detected for SAR and PW of the rumen epithelium. A tendency ( $P < 0.06$ ) to interaction was also observed for RWT but in the opposite way.

## 3.2. Experiment 2

### 3.2.1. Nutrient intakes and performance

Results of nutrient intake are presented in Table 5. Total DM, concentrate and straw DM, OM, CP, ADF, starch, and GE, were not significantly influenced by malate treatment. In contrast, adding malate to the concentrate increased the intakes of NDF ( $P < 0.01$ ), and malate ( $P < 0.001$ ).

Starch source affected intakes of CP (181 vs. 166 g/d,  $P < 0.01$ ), malate (4.7 vs. 3.5 g/d,  $P < 0.001$ ), and straw (61 vs. 48 g/d,  $P < 0.07$ ) which were greater in lambs fed wheat than in those fed manioc-barley. Daily water consumption, in litres per day was not affected by treatment. Interactions (malate  $\times$  starch) were observed ( $P < 0.03$ ) in concentrate and total DM, OM, CP, starch and malate, and ( $P < 0.08$ ) in ADF intakes (Table 5).

Mean BW ( $26.6 \pm 0.51$  kg), ADG ( $0.273 \pm 0.04$  kg) and FCR ( $4.3 \pm 0.68$ ) of lambs were not affected by experimental treatments (Table 6).

### 3.2.2. Apparent total tract digestibility

Results of apparent total tract digestibility are presented in Table 6. Addition of malate decreased ( $P < 0.02$ ) apparent digestibility of DM, OM and ADF. Apparent CP, NDF and GE digestibility were not influenced by malate treatment. In contrast, an effect of source of starch was detected. The digestibility of DM and OM were greater ( $P < 0.03$ ) and those of on NDF ( $P = 0.09$ ) tended to be higher in lambs fed manioc-barley compared to those fed wheat based concentrates. In addition, a malate  $\times$  starch interaction was observed on digestibility of ADF ( $P < 0.02$ ).

### 3.2.3. Faeces pH and consistency

Faeces pH and consistency were mainly modified by source of starch. Lambs fed manioc-barley based concentrate had higher ( $P < 0.02$ ) faeces pH (7.88 vs. 7.36) and faecal consistency (3.1 vs. 2.4) than lambs fed wheat based concentrate. No malate  $\times$  starch interactions were detected in these variables (Table 6).

### 3.2.4. Energy balance

As indicated in table 7, no energy variable was affected by malate treatment ( $P > 0.05$ ). The lambs fed manioc-barley had less energy loss through urine ( $P < 0.10$ ) and tended to have a higher DE and ME ( $P < 0.09$ ) compared with lambs fed wheat based concentrate.

There were no statistically significant malate  $\times$  starch interactions of energy variables with the exception of urinary energy where a tendency ( $P < 0.06$ ) was detected.

### 3.2.5. Nitrogen balance

When the effects of malate and source of starch on N balance of fattening lambs were analyzed (Table 8), no effects of malate treatment were found for any variable.

Intake of N, and faecal N (g/d) did not differ between sources of starch. Nevertheless, digested N tended ( $P < 0.08$ ) to be greater in lambs receiving wheat diets compared to manioc-barley. Urinary N excretion (g/d) was greater ( $P < 0.02$ ) in lambs receiving wheat diets compared to manioc-barley. Total N excretion,

expressed in g/d or as a percentage of N intake, increased ( $P < 0.05$ ) in lambs receiving wheat compared with manioc-barley. However, urine and faeces N, expressed as percentage of total N excretion, did not differ between starch sources.

Total retained N (g/d) did not differ between sources of starch, however, when expressed as a percentage of N intake, decreased ( $P < 0.05$ ) in lambs receiving wheat diets compared to manioc-barley based diets. In contrast, when expressed in percentage of N digested, retained N tended to increase ( $P < 0.07$ ) in lambs receiving wheat.

Malate  $\times$  starch interaction affected N intake, faecal and digested N ( $P < 0.04$ ), which was increased by malate only in wheat diets, and tended ( $P < 0.08$ ) to affect total N excreted. The lambs fed manioc-barley had higher N retained ( $P < 0.05$ ). For other variables no significantly malate  $\times$  starch interactions were observed.

## 4. Discussion

### 4.1. Chemical composition of feed

The CP (179 g/kg DM) and DE (14.07 MJ/kg DM) contents of the concentrates indicate that they were high quality. These values generally agree with data reported in requirement tables of NRC (1985) and were similar with commonly used values in the diets of intensively fattened lambs. Manioc-barley based concentrates were lower in crude protein ( $-15$  g/kg DM) and malate ( $-10$  g/kg DM) content, but higher in ash (16 g/kg DM) than the wheat based concentrates (Table 1); probably due to dosing differences of ingredients in the fabrication process in the case of CP and ash, and in the case of malate as a result of the content of malate in individual feedstuffs. These differences in CP and malate contents were probably relevant for the total nutrient intake and they partly explain the significant interactions between malate and starch source observed, with the effects of malate being, in general, greater in the wheat based concentrate. Castillo et al. (2004) reported that dietary factors are important in determining responses to malic acid addition because the content of malic acid in the basal diet will vary. On the other hand, the effect of the organic acid on lactic acid utilization may largely depend on the general nature of the substrate, since its

utilization may be inhibited by the presence of other preferred substrates (Carro and Ranilla, 2003; Castillo et al., 2004).

## **4.2. Experiment 1**

### **4.2.1. Nutrients intake**

As a consequence of the higher intake of concentrate, OM, CP, GE and malate intakes increased due to addition of malate, the effect being more pronounced in the wheat group (Table 2). Devant and Bach (2004) observed that mean of concentrate intake was greater in malate than in control cows; however, rumen pH did not decrease. In contrast, Garín et al. (2001) and Flores (2004) reported that malate addition (2 g/kg as feed) decreased concentrate intake, but other studies showed that feeding malate to lambs (Carro et al., 2006), dairy cows or steers (Kung et al., 1982), or dairy goats (Salama et al., 2002), Martin et al., 1999; Montaña et al., 1999) had no effect on DMI.

### **4.2.2. Growth performance**

The values of ADG (252 g) found in this trial were very satisfactory for Ripollesa lambs as reported by Torre (1991) and Garín et al. (2001).

Malate increased ADG of lambs, probably as a result of the increased concentrate, OM, CP, GE and malate intakes, the growth rate of lambs receiving a diet of W+M was higher (+34 g) than W group. In contrast, the lambs in MNB+M group had marginally less ADG (-4 g) than their control, which explains the malate × starch interaction detected. The absence of improvement of ADG in MNB+M group could be associated with the low CP content in this concentrate. As a consequence, days at slaughter at constant weight (23 kg BW) were increased with MNB+M, and reduced with W+M diets.

Despite the effects of malate on ADG, its inclusion in the concentrate had no effect on FCR. Carro et al. (2006) reported no effects on FCR when growing lambs were fed a high concentrate diet with 3.8 or 7.5 g/kg of malate (DM basis). However, Garín et al. (2001) and Flores (2004) observed a reduction of FCR when malate (2 g/kg as fed) was fed to lambs. Similarly, Streeter et al. (1994) and Martin et al. (1999), in



steers, and Castillo et al. (2007) in bull calves fed high concentrate diets, observed an improvement in the ADG and FCR, when malate was included in the diet. The lambs eating the manioc-barley based concentrate had a numerically lower FCR (2.9 vs. 3.1) suggesting that mixtures of starch sources have some advantages in some ruminant feeding programs due to synergistic effects of blending starch with different rates of ruminal starch digestion (Bock et al., 1991; Kreikemeier et al., 1987; Stock et al., 1987).

Carcass data were in concordance with results previously reported for the breed (Torre, 1991, Garín et al, 2001). Rumen pH (6.4) was not affected by the addition of malate. However, as measurements were obtained after fasting (5 h), differences could not be appreciated.

#### **4.2.3. Histomorphometric of ruminal mucosa**

The lack of differences between treatments for ruminal mucosa attributed to the addition of malate was expected (Table 4), because of the absence of effects on ruminal pH. Other studies have reported differing ruminal coloration between calves fed different diets (Cozzi et al., 2002) because of different digestible carbohydrate fermentation rate in the rumen. The tendency for a higher PD in the lambs fed malate was not enough to alter the SAR value. PL and PW are the most obvious factors influencing absorptive surface area, but changes in papillae density should also be considered. Dietary and age differences have been found to alter PD of the developing rumen; however, significant differences due to dietary treatment are seldom reported for PD and PW in calves fed milk or concentrate (Zitnan et al , 2005; Lesmeister et al., 2004).

Fermentation of concentrates provides the necessary butyrate to stimulate papillae development, but these feeds may promote keratinization of the papillae in calves and lambs (Thompson et al., 1958; Nocek et al., 1980). Starch source affected the PD, PW and keratinization degree of the ruminal papillae suggesting changes in the ruminal epithelium due to a different amount of ruminal fermentable starch. Flores (2004) found that lambs fed malate added concentrates have less keratinized ruminal papillae; however, cereal type did not significantly affect the keratinization of ruminal papillae in their study.

The malate × starch interaction observed in the SAR, is related with an increment of this parameter in the W+M treatment, and a decrease in the MNB+M. This result is in agreement with the malate × starch interaction which occurred in the ADG.

Difference was observed in the color of the ruminal epithelium, basically because of starch source, rather than other factors, and this could be the result of pigments of the concentrates ingredients. Flores (2004) reported that the ruminal epithelium of lambs fed malate and barley based concentrates showed the clearest colors as a consequence of the lesser effects of acidosis, but in our experiment no differences in rumen pH (averaged 6.4) were observed between treatments. The ruminal wall is the seat of active processes and of interactions with the products resulting from microbial digestion. The modifications of the ruminal epithelium caused by all the evolutionary forms of the ruminal acidosis are of order structural and functional, inflammatory and organic (Garry, 2002).

### **4.3. Experiment 2**

#### **4.3.1. Intake**

The non significant effects of malate supplementation in total DMI in the digestibility experiment agree with results previously reported in lambs (Carro et al., 2006), steers (Martin et al., 1999; Montaña et al., 1999) and dairy cows (Kung et al., 1982), but differ from data reported by Garín et al. (2001) and Flores (2004) in lambs, who observed a decrease in DMI.

Although in the current study lambs were fed barley straw *ad libitum*, the intake of barley straw was very low and ranged from 5.2 to 6.4% of total DM intake. This low intake of straw, lower than the 10 to 15% recommended by NRC (1985), has also been found in previous studies in intensively fattened lambs by Flores (2004) and Carro et al. (2006).

#### **4.3.2. Performance, faeces pH and consistency**

The ADG was normal for the Manchega breed and agreed with previous values reported for the same breed and rearing conditions (Garín et al., 2003, Flores, 2004). Mean ADG of lambs were not affected by any treatment although their values were

improved numerically ( $P = 0.16$ ) in lambs with malate and wheat based concentrates, but not in lambs receiving manioc-barley. These results could be in part associated with the low CP content of the MNB+M concentrate, as described previously. Additionally, no difference was observed in FCR during the digestibility trial. In general, responses to malate addition observed in Exp. 2, particularly those concerning FCR, agree with data obtained in Exp. 1, and reinforce the idea that the malate concentration in the concentrates was probably not high enough to produce changes in the rumen metabolic pathways used by the microbial population, as stated by Martin and Streeter (1995). The same reason could be responsible for impairing malate to stimulate substantially succinate and (or) propionate production by *S. ruminantium* (Castillo et al., 2004), for increasing nutrients digestibility (Carro et al., 1999) or reducing methane synthesis (Callaway and Martin, 1996).

There are no other reports in the available literature on the effect of malate on faecal pH and consistency of lambs. However, there is evidence that low faecal pH and faecal dry matter content are associated with higher residual feed intake (i.e. lower efficiency) (Channon et al., 2004). On average, faecal pH and consistency were higher with manioc-barley diets (0.5 and 0.7 units) than with wheat based diets, respectively, indicating a less rapid fermentation of manioc-barley diets, which implies more growth of microorganisms while maintaining a favourable ruminal environment and subsequent reduction in digestive upset. These results are in agreement with the previously mentioned FCR of manioc-barley diets, that in the first experiment tended to be lower ( $P < 0.12$ ) than in the wheat diets.

#### 4.3.3. Digestibility of the nutrients

The DM, OM and ADF total tract digestibilities were reduced by malate addition (Table 6). The difference of total tract digestibility of DM and OM of malate diets was more evident in wheat than in manioc-barley diets and could be in part attributed to higher ADF excretion, probably due a numerically higher intake of straw observed in W+M group. No significant differences due to malate were observed for digestible and metabolizable energy. This may justify, in part, the lack of improvement of FCR in this trial.

The effects of malate on nutrient digestibility have sometimes been explained by the variations in ruminal fermentation conditions (Martin and Streeter, 1995; Martin et

al., 2000). In ruminants, however, changes in digestibility values are not always followed by variations in productivity (Tjardes et al., 2000). In our study, despite the lower total tract apparent digestibility observed in DM, OM and ADF, the ADG and FCR were not affected by treatments (Table 6).

In contrast with our results, in the studies of Flores (2004), feeding malate at 2 g/kg of lamb concentrate increased the digestibility of DM, OM, CP, NDF, ADF and GE. Additionally, they observed a greater increment of digestibility in barley than in corn based concentrates. Also, some *in vitro* studies with batch cultures of mixed ruminal microorganisms (Carro and Ranilla, 2003) or Rusitec fermenters (Carro et al., 1999; Gómez et al., 2005) showed that malate increased ruminal degradability of diets of diverse composition. In contrast, Carro et al. (2006), also in lambs, reported that malate (3.8 or 7.5 g/kg DM) did not influence apparent digestibility of OM, CP, NDF or ADF. Similarly, total tract digestibility of DM, OM, CP, ADF, NDF, was not affected by malic acid supplementation (Sniffen et al., 2006) in cows supplemented 50 g of malate per day.

Digestibility of OM was higher in manioc-barley than in wheat diets. Other than differences in digestibility of individual ingredients, a possible synergic effect between manioc and barley could have helped to improve OM digestibility and increase digestible and metabolizable energy in manioc-barley diets. The starch digestibility seems to be largely influenced by ruminal conditions or microbial activity as they can be evaluated through VFA concentration and profile, and pH. Intensive fermentation of starch is often associated with high VFA concentrations, large propionate percentages in VFA, and low pH. Unfortunately, these variables were not evaluated in the current study.

#### **4.3.4. Energy and nitrogen balance**

The energy balance was not affected by malate addition. Few studies have investigated the effects of malate on energy and nitrogen balance on growing lambs. Carro et al. (2006) fed a high concentrate diet to growing lambs supplemented with 3.8 or 7.5 g/kg malate and observed no differences in total N urinary excretion. Flores (2004), in lambs fed corn or barley based concentrate, reported that malate addition (2 g/kg as feed) increased estimated DE and EM, and additionally found that lambs fed with malate ingested more N and tended to excrete less N in faeces.

Lambs fed manioc-barley concentrate have lower urinary energy. As a consequence estimated DE and ME tended to be higher in manioc-barley than in wheat based concentrates.

The wheat concentrates in the current study were higher in CP than the manioc-barley based concentrates. The increased urinary N excretion in lambs fed wheat based diets could have been the result of intestinal absorption of amino acids in excess of tissue requirements and/or ammonia absorbed across the ruminal wall or intestine (Willms et al., 1991). Zinn and Owens (1993) suggested that feeding excess protein would place an additional demand on energy or arginine to run the urea cycle, diverting nutrients away from growth. This would explain a tendency of higher intake of DE and ME and a low urine N excretion in the manioc-barley group whose diet was lower in protein than the wheat based one.

## **5. Conclusions**

The comparison of wheat and a mixture of manioc and barley as a source of energy revealed that average daily gain and feed conversion rate in growing lambs was similar, but lambs fed manioc-barley showed better health condition and welfare in accordance with a higher faeces pH and faecal consistency. Manioc-barley diets tended to have higher digestible and metabolizable energy as well as less total nitrogen excreted.

Malate addition at 2 g/kg of concentrate increased dry matter intake and average daily gain of lambs, but did not improve feed conversion ratio and reduced digestibility of acid detergent fiber. The effects of malate were more evident in lambs fed wheat than in those fed manioc-barley based concentrates. These interactions observed between malate and starch sources pinpoint that the responses to the supplementation with malate may be different, depending on the type of ration in which it is included. Other factors to be considered, such as the malate level of basal ingredients or the dose of malate, could condition the possible results.

## **6. References**

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

- Bacha, F., 2002. Nutrición, Patología digestiva y salud intestinal de rumiantes en cebo; aspectos prácticos. En: XVIII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición Y Alimentación Animal. (Eds. Rebollar, P. Ga.; de Blas, C. y Mateos, G.G.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, pp. 141–159.
- Blaxter, K.L., Kielanowsky, J., Thorbek, G., 1969. Energy metabolism of farm animals. Oriel Press Limited, Newcastle Upon Tyne, UK, pp. 522.
- Bock, B.J., Brandt, R.T., Harmon, D.L., Anderson, S.J., Elliot, J.K., Avery, T.B., 1991. Mixtures of wheat and high-moisture corn in finishing diets: feedlot performance and in situ rate of starch digestion in steers. *J. Anim. Sci.* 69, 2703–2710.
- Caja, G., Garín, D., Mesiá, J., 2000. Stimulating rumen fermentation: organic acids salt as growth promoters, *Feed Intr.* 21, 23–25
- Callaway, T.R., Martin, S.A., 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganisms fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* 74, 1982–1989.
- Callaway, T.R., Martin, S.A., Wampler, J.L., Hill, N.S., Hill, G.M., 1997. Malate content of forage varieties commonly fed to cattle. *J. Dairy Sci.* 80, 1651–1655.
- Carro, M.D., López, S., Valdés, C., Ovejero, F.J. 1999. Effect of DLmalate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 79, 279–288.
- Carro, M.D. and Ranilla, M.J. 2002. Aditivos antibioticos promotores del crecimiento: Situación actual y posibles alternativas. *Nutrición. Albéitar* 56, 46–49.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains *Br. J. Nutr.* 89, 181–188.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.*, 84, 405–410.
- Castillo, C., Beditio, J.L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J., 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 101–116.
- Castillo, C., Beditio, J.L., Pereira, V., Vázquez, P., López Alonso, M., Méndez, J., Hernández, J., 2007. Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull

- calves: Influence of chemical form on blood acid–base balance and productive performance, *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 222–235.
- Channon A.F., Rowe J.B., and Herd R.M., 2004. Genetic variation in starch digestion in feedlot cattle and its association with residual feed intake. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44(5) 469 – 474.
- Coverdale, J.A., Tyler, H.D., Quigley, J.D., Brumm, J.A., 2004. Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. *J. Dairy Sci.* 87, 2554–2562
- Cozzi, G., Gottardo, F., Mattiello, S., Canali, E., Scanziani, E., Verga, M., Andrighetto, I., 2002. The provision of solid feeds to veal calves: I. Growth performance, forestomach development, and carcass and meat quality. *J. Anim. Sci.* 80, 357–366.
- Cuesta, A., Ranilla, M.J., Giráldez F.J. Mantecón, A.R., Carro M.D., 2003. Efecto de la inclusión de malato en el pienso de corderos en cebo, sobre la ingestión, la digestibilidad y el rendimiento productivo. *ITEA Prod. Animal.* 24(vol. Extra), 762–764.
- de Blas, C., González, G., Argamentaria, A., 1987. Aditivos para piensos. En: *Nutrición y alimentación del ganado* (Eds. De Blas, C.; González, G. & Argamentaria, A.). Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 454 pp.
- Devant, M., Bach, A., 2004. Effect of malate supplementation on rumen fermentation and milk production in postpartum cows. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl. 1), 47.
- European Commission (EC-DGXI). 1998. Options to reduce methane emissions. Final report, AEAT-3773: issue 3.
- European Union, 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* 10/18/2003:L268/29–L268/43.
- Flores, C., 2004. Improving performance of sheep using fibrolytic enzymes in dairy ewes and malate in fattening lambs. PhD Thesis, Universidad Autónoma de Barcelona, 106 pp.
- Garín, D., Caja, G., Mesia J., 2001. Effects of the use of Gustor XX® as a substitute of growth promoters in the intensive fattening of lambs. *Options méditerranéennes, cahiers.* 54, 181–184.

- Garín, D., Caja, G., Bocquier, F., 2003. Effects of small ruminal boluses used for electronic identification of lambs on the growth and development of the reticulo-rumen. *J. Anim. Sci.* 81, 879–884.
- Garry, F.B., 2002. Indigestion in ruminants. In: *Large Animal Internal Medicine*, Mosby-Year Book. B.P. Smith (Ed). Mosby, St. Louis, Missouri, pp. 722–747.
- Gómez, J. A., Tejido, M.L., Carro, M. D., 2005. Influence of disodium malate on microbial growth and fermentation in Rusitec fermenters receiving medium- and high-concentrate diets. *Br. J. Nutr.* 93, 479–484.
- Hill, S.R., Hopkins, B.A., Davidson, S., Bolt S.M., Diaz, D.E., Brownie, C., Brown, T., Huntington, G.B., Whitlow, L.W., 2005. Technical Note: Technique for Dissection and Analysis of Rumen in Young Calves. *J. Dairy Sci.* 88,324–326.
- Kiernan, I.A., 1990. *Histological and Histochemical Methods: Theory and Practice*, 2nd ed. Pergamon Press, New York, NY
- Krehbiel, C.R., Britton, R.A., Harmon, D.L., Wester, T.J., Stock, R.A., 1995. Effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. *J. Anim. Sci.* 73,3111–3121.
- Kreikemeier, R.A., Stock, D.R., Brink, R.A., Britton, R.A., 1987. Feeding combinations of dry corn and wheat to finishing lambs and cattle. *J. Anim. Sci.* 65, 1647–1654.
- Kung, L.Jr., Huber, J.T., Krummrey, J.D., Allison, L., Cook, R.M., 1982. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization, *J. Dairy Sci.* 65, 1170–1174
- Larson, L.L., Owen, F.G., Albright, J.L., Appleman, R.D., Lamb, R.C., Millar, L.D., 1977. Guidelines toward more uniformity in measuring and reporting calf experimental data. *J. Dairy Sci.* 60, 989–991
- Lesmeister, K.E., Tozer, P.R., Heinrichs, A.J., 2004. Development and analysis of a rumen tissue sampling procedure. *J. Dairy Sci.* 87, 1336–1344.
- Littell, R. C., Milliken, G.A., Stroup, W.W., Wolfinger, R.D., 1996. *SAS. System for Mixed Models*. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216–1231.
- Martin, S.A., Streeter, M. N., 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73, 2141–2145.
- Martin, S.A. 1998. Manipulation of Ruminal fermentation with Organic Acids: A Review. *J. Anim. Sci.* 76, 3123–3132.



- Martin, S.A., Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Hill, G.M., Williams, S.E., 1999. Effects of dl-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77, 1008–1015.
- Martin, S.A., Sullivan, H.M., Evans, J.D., 2000. Effect of Sugars and Malate on Ruminal Microorganisms. *J. Dairy Sci.* 83, 2574–2579.
- McGuffey, R.K., Richardson, L.F., Wilkinson, J.I.D., 2001. Ionophore for dairy cattle: current status and future outlook. *J. Dairy Sci.* 84 (E. Suppl.), E194–E203
- Montaño, M.F., Chai, W., Zinn-Ware, T.E., Zinn, R.A., 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J. Anim. Sci.* 77, 780–784.
- Murphy, M.R., Bald-, R.L., Koong, L.J., 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 55, 411.
- National Research Council. (NRC), 1985. Nutrient Requirement of Sheep. Sixth revised edition. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA. 99 pp.
- Nocek, J. E., Herbein, J.H., Polan, C. E., 1980. Influence of ration physical form, ruminal degradable nitrogen and age on rumen epithelial propionate and acetate transport and some enzymatic activities. *J. Nutr.* 110, 2355–2364.
- Offner, A., Bach, A., Sauvant, D., 2003. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106, 81–93.
- Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W.J., Gill, D.R., 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 275–286.
- Salama, A.A.K., Caja, G., Garín, D., Albanell, E., Such, X., Casals, R., 2002. Effects of adding a mixture of malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on milk production of Murciano-Granadina dairy goats. *Anim. Res.* 51, 295–303.
- Sauvant, D., Giger-Reverdin, S., Meschy, F., 2006. Le contrôle de l'acidose ruminale latente. *INRA Prod. Anim.* 19, 69–78.
- Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Danna, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa, M., Martin S.A., 2006. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127, 13–31
- Stock, R.A., Brink, D.R., Britton, B.A., Goedeken, F.K., Sindt, M.H., Kreikemeier, K.K., Bauer, M.L., Smith, K.K., 1987. Feeding combinations of high moisture corn and dry rolled grain sorghum to finishing steers. *J. Anim. Sci.* 65, 290–302.

- Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Martin, S.A., Williams, S.E., 1994. Effect of malate on ruminal metabolism and performance of steers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 72(Suppl. 1), 384 (Abstr).
- Thompson, G.B., Kintner, L.D., Pfander W.H., 1958. Some effects of ration preparation on alterations of the rumen mucous membrane. *J. Anim. Sci.* 17, 1220–1224.
- Tjardes, K.E., Kuskirk, D.D., Allen, M.S., Ames, N.K., Bourquin, L.D., Rust, S.R., 2000. Brown midrib-3 corn silage improves digestion but not performance of growing beef steers. *J. Anim. Sci.* 78, 2957–2965.
- Torre, C. 1991. Características productivas de ovejas de raza Ripollesa en pureza o cruzamiento con moruecos de raza Merino Precoz y Fleischschaf. Tesis Doctoral, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. 262 pp.
- Underwood, J., 1992. Rumen lactic acidosis. Part I: Epidemiology and pathophysiology. *Compend. Con. Educ. Pract. Vet.* 14, 1127–1134.
- 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. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Wanapat, M., 2003. Manipulation of cassava cultivation and utilization to improve protein to energy biomass for livestock feeding in the tropics. *Asian-Australian J. anim. Sci.* 16, 463-472.
- Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M., Newbold, C.J., 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69:3016–3026.
- Willms, C.L., Berger, L.L., Merchen, N.R., Fahey Jr., G.C., Fernando, R.L. 1991. Effects of increasing crude protein level on nitrogen retention and intestinal supply of amino acids in lambs fed diets based on alkaline hydrogen peroxide-treated wheat straw. *J. Anim. Sci.* 69, 4939–4950.
- Zinn, R.A., and Owens, F.N. 1993. Ruminal escape protein for lightweight feedlot calves. *J. Anim. Sci.* 71, 1677–1687.
- Zitnan, R., kuhla, S., Sanftleben, P., Bilska, A., Schneider, F., Zupcanova, M., Voigt, J., 2005. Diet induced ruminal papillae development in neonatal calves not correlating with rumen butyrate *Vet. Med.–Czech*, 50, (11), 472–479

**Table 1.** Ingredients and chemical composition of experimental concentrates fed to lambs (Exp. 1 and 2)

Item	Treatment <sup>1</sup>			
	W	W+M	MNB	MNB+M
Ingredient composition (g/kg, as fed)				
Barley	60	60	360	360
Wheat	640	640	□	□
Manioc	□	□	320	320
Gluten feed	80	80	40	40
Soybean-44	113	113	209	209
Soybean hulls	40	40	□	□
Calcium carbonate	21	21	20	20
Sal (NaCl)	5	5	5	5
Urea	6	6	6	6
Sugar cane molasses	23	23	20	20
Fat	6	6	13	13
Premix <sup>2</sup>	2	2	2	2
Rumalato <sup>3</sup>	□	2	□	2
Chemical composition (g/kg DM)				
Dry matter (g/kg)	891	892	899	895
Organic matter	933	934	918	914
Ash	67	67	82	86
Crude protein	187	185	172	169
Ether extract	28	26	31	32
Neutral detergent fiber	137	142	135	156
Acid detergent fiber	55	55	57	57
Starch	425	425	418	418
Gross energy (MJ/kg DM)	16.97	16.25	16.34	16.93
Malic acid	2.90	4.70	2.00	3.60

<sup>1</sup> W = wheat without malate; W+M = wheat with malate; MNB = manioc-barley without malate; MNB+M = manioc-barley with malate.

<sup>2</sup> Contained (per kg) 3.5 mg Cu So<sub>4</sub> (OH)<sub>5</sub>, 8000 IU of vitamin A, 2500 IU of vitamin D<sub>3</sub>, 5 mg of vitamin E (□-tocopherol).

<sup>3</sup> Contained (g/kg): 160 of disodium malate and 840 calcium malate (Norel & Nature Nutrition S.A., Madrid, Spain).

**Table 2.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on concentrate nutrients intake of fattening lambs (Exp. 1)

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
Intake, g/d								
Concentrate DM	708	816	712	732	27.2	<b>0.003</b>	<b>0.05</b>	<b>0.03</b>
Organic matter	661	761	654	670	25.5	<b>0.04</b>	<b>0.01</b>	<b>0.03</b>
Crude protein	132	151	123	124	4.8	<b>0.01</b>	<b>0.001</b>	<b>0.03</b>
Neutral detergent fiber	97	116	96	114	3.3	<b>0.001</b>	0.69	0.90
Acid detergent fiber	39	45	40	42	1.3	<b>0.002</b>	0.38	<b>0.02</b>
Starch	301	321	298	306	16.4	0.39	0.58	0.72
Malic acid	2.0	3.8	1.4	2.6	0.11	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.02</b>
Gross energy, MJ/d	12.05	13.27	11.51	12.35	0.356	<b>0.003</b>	<b>0.04</b>	0.53

<sup>1</sup> W = wheat without malate; W+M = wheat with malate, MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

<sup>3</sup> Interaction malate × starch

**Table 3.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on performances, weight and carcass yield of fattening lambs (Exp. 1)

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
Lambs, n	18	18	18	19				
Body weight (BW), kg								
Initial	14.0	13.6	14.2	14.3	0.39	0.77	0.29	0.46
Final	23.5	23.8	23.8	24.0	0.42	0.56	0.63	0.92
Average daily gain, g/d	236	270	253	249	7.8	<b>0.05</b>	0.78	<b>0.02</b>
Feed conversion ratio <sup>4</sup>	3.07	3.07	2.87	2.99	0.089	0.48	0.12	0.49
Days at slaughter								
Actual	43	39	41	43	2	0.53	0.61	0.12
For 23 kg BW	39	35	36	38	1	0.62	0.78	<b>0.04</b>
Carcass weight, kg	12.0	11.8	12.1	12.1	0.29	0.78	0.52	0.68
Carcass yield, %	49.6	49.8	49.4	49.9	0.52	0.51	0.94	0.83

<sup>1</sup> W = wheat without malate; W+M = wheat with malate, MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

<sup>3</sup> Interaction malate × starch

<sup>4</sup> Daily concentrate intake/ADG

**Table 4.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on histomorphometric characteristics of ruminal papillae, ruminal pH and color of ruminal mucosa of fattening lambs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
Surface area ratio, cm <sup>2</sup> /cm <sup>2</sup>	2.22	2.83	2.43	2.21	0.207	0.33	0.30	<b>0.04</b>
Papillae denseness (n <sup>o</sup> /cm <sup>2</sup> )	128	131	90	110	5	0.06	<b>0.001</b>	0.17
Papillae length, µm	1331	1365	1568	1361	78	0.25	0.12	0.11
Papillae width, µm	357	444	492	436	29	0.59	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>
Rumen wall thickness, µm	997	913	815	943	56	0.68	0.16	<b>0.05</b>
Papillae keratin, µm	26.1	27.1	24.4	23.7	1.11	0.89	<b>0.02</b>	0.43
Ruminal pH at slaughter	6.13	6.55	6.60	6.38	0.280	0.70	0.56	0.23
Ruminal mucosa color score <sup>4</sup>	1.60	1.80	2.70	2.55	0.185	0.96	<b>0.001</b>	0.34

<sup>1</sup> W = wheat without malate; W+M = wheat with malate, MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

<sup>3</sup> Interaction malate × starch

<sup>4</sup> 1 = brown, 2 = grey, 3 = dark

**Table 5.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on voluntary intake and water consumption of fattening lambs (Exp. 2)

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
Intake, g/d								
Concentrate DM	908	1001	979	936	28.6	0.39	0.92	<b>0.03</b>
Straw DM	55	68	47	50	6.7	0.26	0.07	0.45
Total DM	963	1029	1026	986	33.1	0.25	0.62	<b>0.02</b>
Organic matter	900	1011	944	904	30.6	0.26	0.32	<b>0.02</b>
Crude protein	172	188	171	161	5.1	0.56	<b>0.01</b>	<b>0.02</b>
Neutral detergent fiber	167	197	169	185	7.7	<b>0.01</b>	0.52	0.39
Acid detergent fiber	74	84	76	75	3.1	0.14	0.27	0.08
Starch	386	426	410	392	12	0.39	0.68	<b>0.03</b>
Malic acid	3.5	5.9	2.7	4.2	0.17	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>0.01</b>
Gross energy (MJ/d)	15.56	16.46	16.00	15.99	0.473	0.38	0.97	0.37
Intake, % total DM								
Straw	6.35	6.41	4.38	5.17	0.639	0.53	<b>0.02</b>	0.58
Malic acid	0.38	0.54	0.26	0.43	0.082	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	0.71
Water consumption								
L/d	2.6	2.6	2.5	2.2	0.14	0.25	0.20	0.26

<sup>1</sup> W = wheat without malate, W+M = wheat with malate. MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

<sup>3</sup> Interaction malate × starch

**Table 6.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on performance, faeces pH, faecal consistency and apparent total tract digestibility coefficients of the diets of fattening lambs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
Body weight, kg	26.5	26.9	26.6	25.7	0.51	0.67	0.29	0.23
Average daily gain, g/d	233	308	300	254	41.4	0.73	0.88	0.16
Feed conversion <sup>4</sup>	4.46	3.89	4.32	4.37	0.686	0.75	0.77	0.63
Faeces pH	7.23	7.48	7.87	7.89	0.189	0.52	<b>0.02</b>	0.60
Faecal consistency score <sup>5</sup>	2.32	2.40	2.98	3.16	0.281	0.64	<b>0.02</b>	0.86
Digestibility, %								
Dry matter	79.09	77.12	79.43	79.08	0.954	<b>0.02</b>	<b>0.03</b>	0.11
Organic matter	80.41	78.49	81.92	81.53	0.462	<b>0.02</b>	<b>0.001</b>	0.12
Crude protein	75.55	75.14	76.14	75.22	0.931	0.16	0.40	0.82
Neutral detergent fiber	45.41	40.83	47.48	45.70	0.219	0.12	0.09	0.41
Acid detergent fiber	42.31	30.86	40.50	37.43	0.253	<b>0.001</b>	0.17	<b>0.02</b>
Gross energy	83.79	82.47	85.48	85.43	0.149	0.65	0.14	0.68

<sup>1</sup> W = wheat without malate, W+M = wheat with malate, MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

<sup>3</sup> Interaction malate × starch

<sup>4</sup> Total dry matter intake/ADG

<sup>5</sup> 1= diarrhoea, 2 = runny, 3 = soft and 4= normal faecal consistency

**Table 7.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on energy balance of fattening lambs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
Gross energy, MJ/d								
Intake	15.33	15.37	16.97	16.41	0.675	0.73	0.24	0.25
Faecal	2.44	2.91	2.40	2.41	0.191	0.24	0.17	0.24
Urinary	0.56	0.64	0.55	0.51	0.252	0.57	<b>0.04</b>	0.06
Total excreted	2.99	3.55	2.95	2.92	0.203	0.23	0.12	0.18
Methane, % Gross energy	6.08	6.10	6.05	6.05	0.029	0.67	0.15	0.70
Methane, MJ/d	0.93	0.99	1.03	0.99	0.043	0.75	0.32	0.25
Digestible energy, MJ/d	12.89	13.45	14.56	14.02	0.633	0.99	0.09	0.39
Metabolizable energy, MJ/d	11.39	11.80	12.99	12.49	0.582	0.93	0.06	0.45

- <sup>1</sup> W = wheat without malate, W+M = wheat with malate, MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate  
<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean  
<sup>3</sup> Interaction malate × starch

**Table 8.** Effects of malate (M) and source of starch (S) on nitrogen (N) balance of fattening lambs

Item	Treatment <sup>1</sup>				SEM <sup>2</sup>	Effect ( <i>P</i> <)		
	W	W+M	MNB	MNB+M		M	S	M × S <sup>3</sup>
N intake, g/d	26.04	30.29	27.62	25.60	1.139	0.34	0.19	<b>0.01</b>
Faecal N, g/d	6.43	7.60	6.54	6.29	0.319	0.18	0.08	<b>0.04</b>
Digested N, g/d	19.61	22.70	21.08	19.30	0.738	0.56	0.36	<b>0.001</b>
N apparent digestion, %	75.30	74.90	76.42	75.17	1.133	0.37	0.06	0.29
Urinary N, g/d	9.43	10.55	8.70	8.49	0.664	0.61	<b>0.02</b>	0.34
Total excreted N, g/d	15.86	18.14	15.24	14.78	0.736	0.38	<b>0.01</b>	0.07
Urine N, % of total	57.20	56.60	55.74	55.07	1.548	0.85	0.28	0.85
Faeces N, % of total	42.80	43.40	44.93	44.93	2.183	0.84	0.27	0.85
% of N intake	60.53	59.70	54.18	56.46	2.275	0.76	<b>0.05</b>	0.51
Retained N, g/d	10.17	12.24	12.36	10.81	0.881	0.78	0.67	<b>0.05</b>
% of N intake	39.46	40.29	45.81	43.54	2.276	0.76	<b>0.05</b>	0.51
% of N digested	46.95	46.38	40.11	42.00	2.864	0.82	0.07	0.67

<sup>1</sup> W = wheat without malate; W+M = wheat with malate, MNB = manioc-barley without malate, MNB+M = manioc-barley with malate

<sup>2</sup> SEM = standard error of the mean

<sup>3</sup> Interaction malate × starch



CAPÍTULO 5:  
**Effect of increasing malate level on performance, ruminal pH and  
fermentation profile of growing lambs fed a high-concentrate diet**

**ABSTRACT:** Two experiments were conducted to evaluate the effect of increasing levels (0, 3, 6 and 9 g/kg of concentrate as fed) of malate on growing lambs. Lambs were fed *ad libitum* with barley straw and pelleted concentrates. In the first experiment, seventy-eight lambs ( $14.6 \pm 0.13$  kg BW) were used in a completely randomized block design to evaluate the effects of malate on lamb growth performance. Total dry matter and concentrate intakes decreased ( $P < 0.04$ ) linearly with increasing malate level, while intake of straw increased ( $P < 0.02$ ), also linearly. Average daily gain (301 g), days at slaughter (31 d), carcass weight (11.5 kg) and carcass yield (49.7%) were not affected by treatments. Feed conversion ratio (FCR) reduced ( $P < 0.02$ ) linearly with malate increased level. There was 18% difference in FCR between lambs consuming the control diet and those with 9 g/kg malate in the concentrate as fed. In the second experiment, thirty lambs ( $24.2 \pm 0.29$  kg BW) were fed the same diets under the same design used in the first experiment to evaluate ruminal pH, ruminal ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) concentration, and total and individual volatile fatty acid (VFA) concentration. Average pH showed a cubic effect ( $P < 0.01$ ) with increasing malate level and was highest (6.1) in lambs fed concentrate with 9 g/kg of malate. Total VFA showed a quadratic increase. Butyrate proportion was increased ( $P < 0.01$ ) linearly with malate increased level, while molar proportion of acetate decreased ( $P < 0.02$ ) linearly and valerate decreased ( $P < 0.03$ ) quadratically. The  $\text{NH}_3\text{-N}$  and Branch-chained VFA concentration, propionate, isobutyrate and isovalerate proportions and acetate to propionate ratio were not modified by malate. In conclusion, feeding increasing levels of malate, under the conditions of our experiment, had beneficial effects by reducing FCR and increasing ruminal pH and VFA concentration.

**Key Words:** Lamb, Growth, Malate, Ruminal fermentation

---

**Abbreviations:** ADF, acid detergent fiber; ADG, average daily gain; BW, body weight; BCFVA, branch-chained VFA; CP, crude protein; d, day; DM, dry matter; DMI, dry matter intake; FCR, feed conversion ratio; NDF, neutral detergent fibre; N, nitrogen;  $\text{NH}_3\text{-N}$ , ammonia nitrogen; OM, organic matter; SAS, statistical analysis system; VFA, volatile fatty acid;

## 1. INTRODUCTION

From a food safety and legal point of view, antibiotics, and ionophores, should not be used as feed additives (Regulation 1831/2003/EU) in the European Union. As an alternative to antibiotics, organic acids (fumarate and malate) may be introduced as feed additives for ruminants (European Commission, 1998; Caja et al., 2000) in order to improve performance.

Malate is a four-carbon dicarboxylic acid that is commonly found in biological tissues and it is an intermediate of the citric acid cycle (Lehninger, 1975). Malate is also a key intermediate in the succinate-propionate pathway and therefore could stimulate propionate production. In fact, malate altered the *in vitro* ruminal fermentation of soluble starch by mixed ruminal microorganisms (Martin and Streeter, 1995) or cracked corn (Callaway and Martin, 1996), resulting in changes in final pH, methane (CH<sub>4</sub>) and volatile fatty acid (VFA) which were analogous to ionophore effects.

Malate supplementation in ruminant diets has been shown to improve average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR) in steers (Streeter et al., 1994; Martin et al., 1999). In contrast, Castillo et al. (2007) have supplemented concentrate for feedlot bull calves with malate (4.0 g/kg/DM), but no improvement on FCR was observed. Kung et al. (1982) reported a positive response in milk production of dairy cows fed diets supplemented with malate. Flores (2004) reported consistent beneficial effects (improving FCR and ADG) using malate (2 g/kg in concentrate) in lambs fed barley (660 g/kg) or corn (600 g/kg) based diets. In contrast, results from previous experiments conducted by our group (*in vivo* studies) indicated that the same dose of malate in lamb fed, either wheat (640 g/kg) or the mixture of barley (360 g/kg) and manioc (320 g/kg), was not effective on improving growing performance (Mungói, 2005). These variable results indicate that dietary factors and doses of malate could be important in determining the response to malate supplementation. The objective of this study was to evaluate the effects of including different doses of malate in the concentrate on growth and carcass performances of growing lambs, ruminal pH, NH<sub>3</sub>-N and VFA profile under intensive fattening conditions.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

Two experiments (Exp. 1; Exp. 2) were conducted in the Experimental Farm of the Servei de Granges i Camps Experimentales (S1GCE) of the Universitat Autònoma de Barcelona in Bellaterra (Spain), from February to April 2006.

### **2.1. Experiment 1. Effect of different levels of malate on growth and carcass performances**

#### **2.1.1. Animals, experimental diets, and management**

A total of seventy-eight Manchega ( $n = 34$ ;  $14.7 \pm 0.22$  kg BW) and Lacaune ( $n = 44$ ;  $14.4 \pm 0.16$  kg BW) 6-wk-old lambs were used in a completely randomized block design. Lambs were born in the flock of the experimental farm of S1GCE of the Universitat Autònoma de Barcelona (Bellaterra, Spain). Newborn lambs were weighed, their navel was disinfected (2% iodine solution in ethanol 96%), and they were tagged in the left ear (2-piece, flexible, plastic, tamper-resistant flaps, 4.1 g; and  $3.8 \times 3.5$  cm, Rumitag). In addition, before weaning ( $\geq 10$  kg) these lambs were identified through an electronic identification (e-ID) system by means of oral administration of ceramic mini-boluses. Lambs suckled from their mothers overnight (1600 to 1000) and were creep-fed a commercial starter concentrate (organic matter (OM), 940; crude protein (CP), 175; ether extract, 49; cellulose, 47; g/kg as-fed; Raltec pelleted prestarter, Serveram, Vic, Spain) until weaning. Lambs were weaned when they weighed more than 12 kg of BW (6 wk of age). Lambs were assigned by weight within sex and breed to eight balanced groups (two per treatment), and intensively fattened until they reached the slaughtering market weight (23 kg of BW) as Spanish "Pascual" lambs. The experimental treatments consisted of four pelleted concentrates with different levels of inclusion of malate (Rumalato<sup>®</sup>, Norel & Nature Nutrition S. A., Madrid, Spain) containing 850 of E 296 DL-Malic acid and 15 g/kg of calcium carbonate and sodium bicarbonate as excipient. The treatments were: Control, M-0 = 0; Low dose, M-3 = 3; Medium dose, M-6 = 6; and High dose, M-9 = 9 g/kg of malate in the concentrate as fed. The experimental concentrates were

pelletized and contained corn, barley, wheat, soybean meal as main energy and protein sources (Table 1). The increasing levels of malate were included by substituting an equal quantity of barley. Concentrates were designed to meet nutrient recommendations of a 30 kg lamb with an ADG of 0.300 kg/d (NRC, 1985). Lambs were fed *ad libitum* experimental concentrates and barley straw, and always had access to fresh water. Barley straw contained 942 g/kg DM and (g/kg DM), OM, 946; CP; 33; neutral detergent fiber (NDF), 776; Acid detergent fiber (ADF); 458; and malate 16. During the experiment (32 d) the lambs were housed in pens equipped with a hopper for concentrate, a rack for straw and automatic drinker. The lambs were slaughtered at a commercial plant, when they reached the slaughtering weight, where carcass hot weight was recorded.

### **2.1.2. Measurements, calculations and analysis**

Lambs were individually weighed (precision 0.1 kg) weekly throughout the experiment before offering feed. Average feed intake was calculated as the difference between the total amounts of feed offered and refused. Concentrate and straw orts by lamb pen were removed and weighed weekly (precision 10 g) during the experiment. The ADG for individual lambs was calculated using weekly measurements of body weight. The average FCR for each lamb was calculated as daily DMI/ADG.

Samples of all concentrates and barley straw were collected every 2 weeks and stored at room temperature before chemical composition analysis. The feed samples of concentrate and the barley straw were ground through a 1-mm stainless steel screen (P. PRAT S. A. Sabadell, Spain) and were analyzed for DM by drying samples for 24 h at 103 °C (ID number 950.02 AOAC, 1990) in a forced-air oven, and ash for 4 h at 550 °C (ID number 942.05; AOAC, 1990). Organic matter was calculated as the difference between DM and ash content. CP was determined by the Kjeldahl procedure (ID number 984.13; AOAC, 1990). Fiber fractionation was analyzed sequentially (Van Soest et al., 1991), using an Ankom Fiber Analyzer incubator (Ankom Technology, Fairport, NY). ADF and NDF, the latter using a heat stable alpha-amylase and sodium sulfite, are expressed exclusive of residual ash.

For malate determination, 0.5 g of each ground feed sample was mixed with 12.5 mL of deionized water in a glass tube and were boiled in a 100° C water bath for 30 min. The samples were then mixed using a glass-stirring rod to release organic acids from the cellular membranes. The slurry was filtered and the tube and the residue were rinsed with 12.5 mL of deionized water to remove malate residues. The filtrate was collected for the analysis of malate by High-Performance Liquid Chromatography (Waters 600E, Waters 486 UV absorption detector at 214 nm, D-2500 Merck-Hitachi integrator, 100- $\mu$ L loop; Waters HPLC system, Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA) at 35 °C using a Bio-Rad HPX-87H Aminex organic column (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The samples were eluted from the column with 4 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup> and malate was expressed as the anion of malic acid. All analyses were performed in duplicate, and average values were used for calculations.

## **2.2. Experiment 2. Effect of different levels of malate on growth, ruminal pH, ammonia nitrogen and volatile fatty acids of fattening lambs**

### **2.2.1. Animals, experimental diets, and management**

A 43-d study was conducted using thirty 10-wk-old female lambs (Manchega, n = 12; 24.1 ± 0.48 kg BW; and Lacaune, n = 18; 24.4 ± 0.36 kg BW) that were randomly allotted to four malate treatments involving the same four diets used in Exp.1 (0, 3, 6 and 9 g/kg, as fed). The objectives were to evaluate the effects of feeding concentrates with increasing levels of malate on growth performance and ruminal pH, NH<sub>3</sub>-N and VFA.

The lambs were allocated into four groups according to their previous allocation treatments, and kept in the same conditions as lambs in Exp. 1.

### **2.2.2. Measurements, calculations and analysis**

Body weight was measured, feed intake recorded, and the samples of feeds were collected and analyzed using the same procedures described in Exp.1.

Ruminal fluid was removed from each lamb between 1100 to 1300 h when lambs achieved 33-35 kg of BW, using an oro-ruminal probe and vacuum pump, as described by Geishauser and Gitzel (1996). The ruminal fluid was strained through two layers of cheesecloth. The pH was determined immediately using a glass electrode portable pH-meter (model 507, CRISON, Alella, Barcelona, Spain). Two additional sub-samples of ruminal fluid were taken for the analysis of NH<sub>3</sub>-N, and VFA concentrations.

Samples for VFA analysis were prepared as described by Jouany (1982). In short, 1 mL of a solution made up of a 2 g/L solution of mercuric chloride to impede microbial growth, 2 g/L of 4-methylvaleric acid as an internal standard, and 20 mL/L orthophosphoric acid, were added to 4 mL of filtered fermenter fluid and frozen (-20 °C) until analysis. Samples were thawed and centrifuged at 3000×g for 30 min, and the supernatant was analysed by gas chromatography (model 6890, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) using a polyethylene glycol nitroterephthalic acid-treated capillary column (BP21, SGE, Europe Ltd., Buckinghamshire, UK). NH<sub>3</sub>-N was determined in a 4 ml sample of filtered fermenter fluid acidified with 4 mL of 0.2 N HCL and frozen at -20 °C. Samples were later thawed and then centrifuged at 25,000×g for 20 min, and the supernatant was analysed by visible spectrophotometry for NH<sub>3</sub>-N (Chaney and Marbach, 1962).

### 2.3. Statistical analysis

Results from Experiments 1 and 2 were analyzed independently using the MIXED procedure of SAS (SAS v. 9.1; SAS Inst., Inc., Cary, NC).

For generate weekly data of group DMI, the statistical model contained the fixed effects of treatment (level of malate), week as the repeated factor and group as random effect, their interactions and the residual error. When an interaction effect was not significant it was deleted from the model. The model used was:

$$Y_{ijkl} = \mu + Tr_i + W_j + (TrW)_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

For the analyses of linear, quadratic or cubic effects of malate concentration on DMI the model for repeated measures used was:

$$Y_{ijl} = \mu + \alpha Tr_i + W_j + (TrW)_{ij} + \varepsilon_{ijl}$$

$$Y_{ijl} = \mu + Tr_i + \beta Tr_i^2 + W_j + (TrW)_{ij} + \varepsilon_{ijl}$$

$$Y_{ijl} = \mu + Tr_i + Tr_i^2 + \gamma Tr_i^3 + W_j + (TrW)_{ij} + \varepsilon_{ijl}$$

Where:

$Y_{ijk}$  = is the variable analyzed.

$\mu$  = is the overall mean effect.

$\alpha Tr_i$  = is the linear term of the treatment effect.

$\beta Tr_i^2$  is the quadratic term of treatment effect.

$\gamma Tr_i^3$  = is the cubic term of treatment effect.

$W_j$  = is the week effect.  $(TrW)_{ik}$  = is a fixed interaction.

$\varepsilon_{ijk}$  = is the random error

Measures were also subjected to covariance structures of the fit statistics (compound symmetric and autoregressive order one covariance). The covariance structure that yielded the largest Schwarz's Bayesian criterion was considered to be the most desirable analysis (Littell et al., 1998).

To generate means of treatments for initial and final BW, ADG, FCR, days at slaughter (actual and constant weight), carcass weight and yield, pH, NH<sub>3</sub>-N, and VFA, the model took into account the fixed effects of treatment, sex, breed, group as the random effect, the first order interaction of these effects and residual error. Whenever an effect or interaction between fixed effects was not significant it was taken out from the model. Lamb weight at the start of the experiment was included as co-variable. The statistical model used was:

$$Y_{ijk} = \mu + Tr_i + B_j + S_k + (TrB)_{ij} + (TrS)_{ik} + (TrBS)_{ik} + (BS)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

For analyses of linear, quadratic or cubic effects of malate concentration on the dependent variable, the treatment effect was set as a continuous variable and analyzed with the Type I analysis of variance in the following model:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha Tr_i + \beta Tr_i^2 + \gamma Tr_i^3 + B_j + S_k + (TrB)_{ij} + (TrS)_{ik} + (TrBS)_{ik} + (BS)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

Where:

$Y_{ijk}$  = is the dependent variable analyzed.

$\mu$  = is the overall mean effect.

$\alpha Tr_i$  = is the linear term of the diet effect.

$\beta Tr_i^2$  = is the quadratic term of diet effect.



$\gamma Tr_i^3$  = is the cubic term of diet effect.

$B_j$  = is the breed effect.

$S_k$  = is the sex effect.

$(TrB)_{ij}$  = is a fixed interaction between treatment and breed.

$(TrS)_{ik}$  = is a fixed interaction between treatment and sex.

$(TrBS)_{ijk}$  = is a fixed interaction between treatment and breed and sex.

$(BS)_{ik}$  = is a fixed interaction between breed and sex.

$\varepsilon_{ijkl}$  = is the random error

Treatment results are reported as least square means. Significance was declared at  $P < 0.05$  and tendencies are discussed at  $P < 0.10$ .

### 3. RESULTS

#### 3.1. Experiment 1

##### 3.1.1. Effect on Intake

The intake variables (total DMI, concentrate, straw, OM, CP, NDF, ADF, and malate) of lambs in all treatment groups are shown in Table 2. Total DM, OM and CP intakes, decreased linearly ( $P < 0.04$ ) with increasing malate level in the diet. This decrease was the result of the linear decrease ( $P < 0.05$ ) in concentrate and linear increase ( $P < 0.01$ ) for straw with increasing malate level. The linear increase in straw DMI and decrease in concentrate DMI also resulted in a linear increase ( $P < 0.01$ ) in the straw proportion in the total consumed diet (6.2, 8.5, 9.1 and 10.1% for 0, 3, 6 and 9 g/kg malate added to the concentrate, respectively.)

In addition, total NDF intake tended to increase quadratically ( $P < 0.10$ ), and the total intake of ADF increased quadratically ( $P < 0.05$ ). As expected, total malate intake, increased linearly ( $P < 0.001$ ) with the increase of malate level in the concentrate.

##### 3.1.2. Effect on performance

Initial ( $14.5 \pm 0.13$  kg) and final BW ( $23.4 \pm 0.13$  kg) were not affected by treatments. Additionally, days at slaughter actual (31 d) and at constant weight (30 d) were also similar in the four treatments (Table 3), as well as the ADG ( $294 \pm 8.4$  g/d).

As a consequence of the decrease of total DMI but similar ADG in lambs fed increasing levels of malate, there was a linear decrease ( $P < 0.03$ ) in FCR. The FCR of lambs fed the highest dose of malate (9 g/kg) was 15% lower than the control.

Carcass weight and carcass yield did not differ between treatment groups (Table 3) and averaged 11.5 kg and 49.7 %, respectively.

## 3.2. Experiment 2

### 3.2.1. Effect on Intake

The intake data is show in Table 4. Total malate intake, as expected, increased ( $P < 0.01$ ) linearly due to increasing malate concentrations in the diet. Total DMI showed a tendency to a cubic ( $P < 0.08$ ) pattern, decreasing with increasing addition of malate in the diet. This decrease was the result of the cubic decrease ( $P < 0.05$ ) in concentrate intake and the cubic ( $P < 0.10$ ) increase trends for straw intake with increasing malate levels. Similarly, malate level in the diet had no effect ( $P > 0.05$ ) on total intakes of OM, CP, NDF and ADF of the growing lambs.

### 3.2.2. Effect on performance

As in Exp.1, feeding different levels of malate in the diet had no effect ( $P > 0.05$ ) on initial ( $24.3 \pm 0.28$  kg) and final BW ( $36.6 \pm 0.67$  kg). Also, ADG was not affected by treatments and averaged  $286 \pm 7.6$  g/d (Table 5).

As a consequence of the cubic trends in total DMI and the similar ADG in lambs fed different malate level, cubic effects on FCR ( $P < 0.05$ ) and concentrate conversion rate ( $P < 0.001$ ) were found. The FCR of the higher dose malate was 16% lower than control.

### 3.2.3. Effect on ruminal pH, ammonia N and volatile fatty acids

Ruminal pH varied from 5.4 in lambs fed the concentrate with 6 g/kg, to 6.1 in lambs fed the concentrate with 9 g/kg added malate. Malate level in the concentrate had a cubic effect ( $P < 0.01$ ) on ruminal pH (Table 5), that increased from 5.65 in the

control to 6.06 with 9 g/kg of malate, but decreased to 5.41 in lambs fed 6 g/kg of malate.

Malate level in the concentrate had no effect ( $P > 0.05$ ) on  $\text{NH}_3\text{-N}$  ( $4.7 \pm 0.4$  mg/100 mL) concentration, but increased the total VFA concentration (linear and quadratically,  $P < 0.02$ ), the greatest values being found at 6 g/kg added malate (Table 5).

Molar proportion of acetate and valerate were decreased ( $P < 0.03$ ) linearly and quadratically, respectively, whereas the proportion of butyrate was increased linearly ( $P < 0.01$ ) due to increasing malate level (Table 5). In contrast, there were no significant changes ( $P > 0.05$ ) in the molar proportions of propionate, isobutyrate, isovalerate, concentration of branch-chained VFA (BCVFA) and acetate propionate ratio attributable to malate concentration level (Table 5).

## **4. Discussion**

### **4.1. Experiment 1**

#### **4.1.1. Intake**

Carro et al. (2006) reported that supplementing the diet of growing lambs with malate (4 or 8 g/kg of concentrate) did not affect intakes of concentrate and barley straw. In contrast with this study, in which concentrate decreased linearly and the barley straw increased linearly with increasing malate level (0, 3, 6 or 9 g/kg of concentrate). Dry matter intake in ruminants is regulated by the physical, metabolic and chemostatic factors, in addition to the psychologic and sensory ability of animals (Baumont, 1996). The diet selection for a higher forage proportion observed in this trial was probably in response to addition of malate. Malate is a key compound in major metabolic pathways for energy and nutrient utilization in mammals (Hill et al., 1997), energy which may give signals associated with the acquisition of barley straw preferences in line with Provenza, (1995) and Villalba and Provenza (1997) who established that the postingestive feedback signals (i.e., VFA, even at low concentration) modify food preferences of ruminants.

There are other possible hypothesis for the reduced concentrate intake related with the presence of organoleptic factors that inhibited intake. The ability of lambs to discriminate between several chemicals and flavours in feeds and their effect on DMI has been demonstrated (Grofum and Chapman, 1988). However, the reduction in DMI should not be interpreted as a negative effect, because many growth promoters in beef (i.e., ionophores) improve feed conversion index by reducing DMI while maintaining ADG (Chalupa, 1980).

Flores (2004) reported that malate addition (2 g/kg as feed) decreased concentrate intake (8 and 11%) in lambs. Similarly, Garín et al. (2001) observed reduction in concentrate intake (11%). In contrast, Devant and Bach (2004) observed that mean of concentrate intake was greater in malate than in control cows (14%). Other previous studies with malic acid showed that feeding malate to dairy cows (Kung et al., 1982), dairy goats (Salama et al., 2002), or steers (Kung et al., 1982; Martin et al., 1999; Montaña et al., 1999) had no effect on DMI.

In this trial, OM and CP intakes followed the same pattern as total DMI. However, total NDF intake and ADF intake tended to increase quadratically with increased malate concentration. This could be related with the linear increase of barley straw intake.

As a consequence of these results on intake (decrease) and similar ADG between treatments, FCR linearly improved when malate was added to the diet probably because of more efficient ruminal fermentation, in line with Martin and Nisbet (1992).

#### **4.1.2. Lambs performance**

A diversity of results has been observed concerning the effects of malate in improving animal performance. Contrary to our results, Carro et al. (2006) did not find any effect on FCR of lambs fed corn (50%) and barley (30%) based concentrate supplemented with malate at 4.0 or 8.0 g/kg of concentrate. Similarly, Cuesta et al. (2003) did not observe effects on the performance of the lambs fed malate at a rate of 4.0 g/kg of concentrate. In other study, Flores (2004) reported reduced FCR by 18% due in part in to a significant increase (14%) in ADG of the supplemented lambs. In agreement with the present study, in intensively fattened lambs fed barley based concentrates supplemented with a mixture of malate and yeast, Garín et al.

(2001) observed significant reductions in intake (11%) and FCR (7%), but not in ADG.

The effects of malate have also been studied in beef cattle obtaining diverse results. Martin et al. (1999) have supplemented finishing diets for feedlot cattle with malate at different dosages (40–120 g/head/day). In general, the addition of malate caused a linear increase of ADG and reduction of FCR. Nevertheless, in some trials, the improvements were observed in periods of adaptation to rations. Castillo et al. (2007) supplemented concentrate for calves with different chemical form of the organic acid (4.0 g/kg/DM, free acid or salt) and concluded that the efficiency of malic acid supplementation varies depending on its chemical forms and on productive stage of the animals. Even though similar values were observed using the salt form or the free acid in the growing period, better results were obtained with the acid forms in the finishing period in terms of reduction of DMI (7 and 12% for malate salt and malate acid, respectively), but no improvement of FCR was observed.

Other studies have shown inconsistent results of malic acid on milk yield. While in studies of Devant and Bach (2004) and Sniffen et al. (2006), milk yield increased with malic acid supplementation, Kung et al. (1982) and Vicini et al. (2003) observed no effect of malic acid on milk yield. The reason for the difference between studies is unclear but may be due to differences in the basal content of malic acid in the diets or the dose of malate supplemented.

## **4.2. Experiment 2**

### **4.2.1. Intake and performance**

In this experiment, the intake of total DMI tended to decrease cubically while that in Exp. 1 was linear. Such a tendency was the result of the cubic decrease of concentrate intake and tendency to decrease straw intake with increasing level of malate level. On the other hand, proportions of straw intake in total DMI were low (3.8 to 8.31%) when compared with Exp. 1 and were not significantly affected by dietary treatments.

The higher level of malate inclusion (9 g/kg concentrate basis) reduced total DMI (18%) but the ADG was not affected in the present experiment which explains the reduced FCR by 18%, in line with Exp. 1, when compared to control. The greater

concentrate intake observed in the 6 g/kg malate treatment was unexpected and this can justify partly the lower FCR found with this treatment.

Responses to supplemental malate have been variable. Carro et al. (2006) feeding lambs with high concentrate diets, did not have any effect on FCR and DMI. Castillo et al. (2007) supplemented concentrate for calves with different chemical forms of the malic acid (4 g/kg DM, free acid or salt) but they did not observe any improvement of the FCR despite the reduction of DMI. Feeding a corn or a barley based diet with 2.0 g of malate/kg of concentrate (Flores, 2004) increased ADG, decreased DMI and improved FCR in lambs. Streeter et al. (1994) and Martin et al. (1999), in steers fed high concentrate diets, observed an improvement in FCR, when increasing levels of malate in agreement with the FCR improvement observed in our experiment.

#### **4.2.2. Ruminal pH, concentrations of ammonia N and volatile fatty acids - Ruminal fermentation**

Few studies have investigated the effects of malate on ruminal pH or on concentrations of NH<sub>3</sub>-N and VFA in growing lambs. Ruminal pH varied between treatments, the pH of control lambs was 0.41 units lower than the pH of lambs fed the higher level of malate concentration. The lower pH (5.4) found in the 6 g/kg malate level agrees with the lower FCR observed in this treatment, and is associated with a higher total VFA concentration. Increase in ruminal pH by malate agrees with Flores (2004) who reported that lambs fed barley based concentrate with 2 g/kg malate showed greater pH than control. Similarly, Streeter et al. (1999) reported a linear increase in ruminal pH when steers received a malate ruminal infusion at different doses (27 to 80 g/d). In contrast, Carro et al. (2006) did not observe any effect of malate on pH of lambs at slaughter. In addition Devant and Bach (2004) found that cows fed a diet containing 84 g supplemental malate, consumed more concentrate than the control, but had similar ruminal pH. These authors suggested that malate might be effective in preventing ruminal acidosis.

Martin (1998) proposed that malate, as salivation promotant, may increase salivary flow into the rumen to help buffer it and alleviate acidosis. Additionally, Martin et al. (1999) suggested that stimulation of *S. ruminantium* in mixed culture by malate addition helps to increase ruminal pH by increasing lactate utilization as well as the concentration of CO<sub>2</sub>.

Volatile fatty acids are the end products of rumen microbial fermentation, and represent the main supply of metabolizable energy for the ruminant (Van Soest, 1982). A reduction in the VFA production would be nutritionally unfavourable for the animal. However, total VFA concentration was higher (8–24%) in the added malate diets, which suggests that malate modify diet fermentability and energy availability. This is consistent with the result obtained in another study of Kung et al. (1982) who found that added malate increases total VFA concentrations in early lactation cows. Additionally, increases of total VFA production caused by malate addition have been consistently found on *in vitro* studies (Martin and Streeter 1995; Callaway and Martin, 1996; Carro et al., 1999; Martin et al., 2000; Carro and Ranilla, 2003; Tejido et al., 2005; Gómez et al., 2005). However, in the studies of Kung et al. (1982); Martin et al. (1999); Montaña et al. (1999), Martin, 2004; Ouarti et al. (2006); Cardozo et al. (2006); Sniffen et al. (2006) and Carro et al. (2006) malate did not affect total VFA in rumen.

In the current study, feeding malate decreased the molar proportions of acetate (5–13%) and valerate (8–60%), and increased the butyrate proportion (63–71%), but had no effect on propionate proportion or on the acetate:propionate ratio. Other authors (Martin et al., 1999; Montaña et al., 1999 and Carro et al., 2006) did not find effects on molar proportions of acetate, propionate and butyrate. The increase in molar proportion of butyrate observed in this study, due to malate supplementation is in agreement with previous results in growing lambs receiving 3.8 or 7.5 g/kg of DM of malate (Carro et al., 2006), in dairy cows receiving 70 to 140 g/d of malic acid (Kung et al., 1982) and in several *in vitro* experiments (Callaway and Martin, 1996; Carro and Ranilla, 2003; Gómez et al., 2005).

Our results suggest that the main effects of malate focused on the decrease of acetate and the increase of butyrate proportions, whereas no effect on the proportion of propionate was observed. This fact suggests that, in contrast with the mechanism of action of monensin, which specifically inhibits rumen gram-positive bacteria (Dennis et al., 1981), resulting in increased ruminal propionate concentration and decreased of acetate and butyrate molar proportions in ruminally cannulated cows (Broderick, 2004), The mechanism of action of malate, could to be similar to those observed by Martin and Macy (1985) with methane inhibitors *in vitro*.

In the present trial, there were no effects of malate on NH<sub>3</sub>-N concentration. Most of the reported research found inconsistent effects of malate on ammonia N

concentration. Studies with malate seems not to affect  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration in growing lambs (Carro et al., 2006), in heifers (Cardozo et al., 2006), in dairy cows (Kung et al., 1982) and in ruminal fluid of sheep fed a 50:50 forage:concentrate ratio in a RUSITEC system (Carro et al., 1999).

## 5. Conclusions

The addition of malate to high concentrate diets of growing lambs reduced total DMI, especially when it was used at high levels. This decrease was the result of the decrease of concentrate DMI and increase of straw DMI.

Malate treatment did not have any effect on ADG or on weight and yield hot carcass of growing lambs. In contrast, feeding supplement malate to growing lambs improved the FCR as a consequence of reduced total DMI and similar ADG between treatments.

The addition of malate modified the ruminal environment, by increased total VFA concentration and molar proportions of butyrate and valerate, and decreasing acetate.

The results of both experiments suggest that malate supplementation provides additional benefits by improvement of feed efficiency.

## 6. References

- Association of Official Analytical Chemists, 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Washington, DC, USA.
- Baumont, R., 1996. Palatability and feeding behaviour in ruminants. A review. *Ann. Zootech.* 45, 385–400.
- Broderick, G. A., 2004. Effect of low level monensin supplementation on the production of dairy cows fed alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 87, 359–368.
- Caja, G., Garín, D., Mesiá, J., 2000. Stimulating rumen fermentation: organic acids salt as growth promoters. *Feed Intr.* 21, 23–25
- Callaway, T.R., Martin, S.A., 1996. Effects of organic acid and monensin treatment on in vitro mixed ruminal microorganisms fermentation of cracked corn. *J. Anim. Sci.* 74, 1982–1989.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C., 2006. Effects of alfalfa extract, anise, capsicum, and a mixture of cinnamaldehyde and eugenol on ruminal



- fermentation and protein degradation in beef heifers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84, 2801–2808.
- Carro, M.D., Lopez, S., Valdés, C., Ovejero F.J., 1999. Effect of DL-malate on mixed ruminal microorganism fermentation using the rumen simulation technique (RUSITEC). *Anim. Feed Sci. Technol.* 79, 279–288.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *Br. J. Nutr.* 89, 181–187.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84, 405–410.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Pereira, V., Vázquez, P., López Alonso, M., Méndez, J., Hernández, J., 2007. Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull calves: Influence of chemical form on blood acid–base balance and productive performance. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 222–235.
- Chalupa, W., Corbett, W., Brethour, J.R., 1980. Effects of monensin and ampicillin on rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* 51, 170–179.
- Chaney, A.L., Marbach, E.P., 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8, 130–132.
- Commission Directive 98/64/EC, 1998. Official Journal of the European Communities of the 3 September 1998. No. L257, 0014–0028.
- Cuesta, A., Ranilla, M.J., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Carro, M.D., 2003. Efecto de la inclusión de malato en el pienso de corderos en cebo, sobre la ingestión, la digestibilidad y el rendimiento productivo. *ITEA Prod. Animal.* 24 (vol. extra), 762–764.
- Dennis, S.M., Nagaraja, T.G., Barley, E.E., 1981. Effects of lasalocid or monensin on lactate-producing or using rumen bacteria. *J. Anim. Sci.* 52, 418–426
- Devant, M., Bach, A., 2004. Effect of malate supplementation on rumen fermentation and milk production in postpartum cows. *J. Dairy Sci.* 87 (Suppl. 1), 47 (Abstr.).
- European Union. 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* 10/18/2003:L268/29–L268/43.

- Flores, C., 2004. Improving performance of sheep using fibrolytic enzymes in dairy ewes and malate in fattening lambs. PhD Thesis, Universidad Autónoma de Barcelona, 106 pp.
- Garín, D., Caja, G., Mesia J., 2001. Effects of the use of Gustor XX<sup>®</sup> as a substitute of growth promoters in the intensive fattening of lambs. *Options Méditerranéennes, Cahiers*. 54, 181–184.
- Geishauser, T., Gitzel, A., 1996. A comparison of rumen fluid sampled by oro-ruminal probe versus rumen fistula. *Small Rum. Res.* 21, 63-69.
- Gómez, J.A., Tejido, M.L., Carro, M.D., 2004. Effects of disodium malate on microbial growth and rumen fermentation of two diets in Rusitec fermenters. *J. Anim. Feed Sci.* 13 (Suppl. 1), 71–74.
- Grovum, W.L., Chapman H.W., 1988. Factors affecting the voluntary intake of food by sheep: 4. The effect of additives representing the primary tastes on sham intakes by esophageally-fistulated sheep. *Br. J. Nutr.* 59, 63–73.
- Hill, G.M., Martin, S.A., Streeter, M.N., Mathis, M.J., Watson, R.S., 1997. Dietary Malate Additions to Feedlot Cattle Diets: Performance and Plasma Components Effects. Available: <http://www.ads.uga.edu/annrpt/>. Accessed 01, 09, 2001.
- Jouany, J.P., 1982. Volatile fatty acids and alcohol determination in digestive contents, silage juice, bacterial cultures and anaerobic fermenter contents. *Sci. Aliments*. 2, 131–144.
- Kung Jr., L., Huber, J.T, Krummrey, J.D., Allison, L., Cook, R.M., 1982. Influence of adding malic acid to dairy cattle rations on milk production, rumen volatile acids, digestibility, and nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.* 65, 1170–1174.
- Lehninger, A.L., 1975. *Biochemistry* (2nd Ed.). Worth Publishers, NY.
- Littell, R.C., Henry, P.R., Ammerman, C.B., 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76, 1216–1231.
- Martin, S.A., 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 3123–3132
- Martin, S.A., Macy, J.M., 1985. Effects of monensin, pyromellitic diimide and 2-bromoethanosulfonic acid on rumen fermentation in vitro. *J. Anim. Sci.* 60, 544–550.
- Martin, S.A., Nisbet. D.J., 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 75, 1736–1744.

- Martin, S.A., Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Hill, G.M., Williams, S.E., 1999. Effects of dl-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77, 1008–1015.
- Martin S.A., Sullivan, H.M., Evans, J.D., 2000 Effect of Sugars and Malate on Ruminal Microorganisms. *J. Dairy Sci.* 83, 2574–2579.
- Martin, S.A. 2004 Effects of DL-Malate on In Vitro Forage Fiber Digestion by Mixed Ruminal Microorganisms *Current Microbiology.* 48. 27–31.
- Martin, S.A., Streeter, M.N., 1995. Effect of malate on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *J. Anim. Sci.* 73, 2141–2145.
- Montaño, M.F., Chai, W., Zinn-Ware, T.E., Zinn, R.A., 1999. Influence of malic acid supplementation on ruminal pH, lactic acid utilization, and digestive function in steers fed high-concentrate finishing diets. *J. Anim. Sci.* 77, 780–784.
- Mungóí, M.A.T., 2005. Efectos del malato y de la fuente de almidón en el cebo de corderos de raza Ripollesa (in Spanish, with English abstract). Master of Science Thesis. Universidad Autónoma de Barcelona, 75 pp.
- National Research Council, 1985. Nutrient Requirement of Sheep. Sixth revised edition. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Ouarti, M., González. J., Fernandes, L.F.J., Alvir. M.R., Rodríguez, C.A. 2006. Malic acid combined with heat treatment to protect protein from soybean meal against rumen degradation. *Anim. Res.* 55, 165–175
- Provenza, F.D., 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *J. Range Manage.* 48, 2.
- Salama, A.A.K., Caja, G., Carin, D., Albanell, E., Such, X., Casals, R., 2002. Effects of adding a mixture of malate and yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on milk production of Muriciano-Granadina dairy goats. *Anim. Res.* 51, 295–303.
- Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Danna, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa M, Martin, S.A., 2006. Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127, 13–31.
- Statistical Analysis Systems, 2004. User's Guide: Statistics, Version 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA.

- Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Martin, S.A., Williams, S.E., 1994. Effect of malate on ruminal metabolism and performance of steers fed a high concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 72(Suppl. 1), 384 (Abstr.).
- Tejido, M.L., Ranilla, M.J., García-Martínez, R., Carro, M.D., 2005. In vitro microbial growth and rumen fermentation of different diets as affected by the addition of disodium malate. *Anim. Sci.* 81, 31–38.
- 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. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.
- Vicini, J.L., Bateman, H.G., Bhat, M.K., Clark, J.H., Erdman, R.A., Phipps, R.H., Van Amburgh, M.E., Hartnell, G.F., Hintz, R.L., Hard, D.L., 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* 86, 576–585.
- Villalba, J.J., F.D. Provenza, 1997. Preference for wheat straw by lambs conditioned with intraruminal infusions of starch. *Br. J. Nutr.* 77, 287–297.

**Table 1.** Ingredients and chemical composition of experimental concentrates fed to lambs, containing increasing levels of malate<sup>1</sup>

Item	Malate treatment (g/kg of concentrate)			
	0	3	6	9
Ingredient composition (g/kg)				
Corn	300	300	300	300
Wheat	100	100	100	100
Barley	309	306	303	300
Gluten feed	40	40	40	40
Soybean-44	190	190	190	190
Carob bean	20	20	20	20
Sugar cane molasses	15	15	15	15
Rumalato (Malate)	0	3	6	9
Calcium carbonate	18	18	18	18
Salt	4	4	4	4
Premix <sup>2</sup>	4	4	4	4
Chemical composition (g/kg DM)				
Dry matter (g/kg)	878	879	881	882
Organic matter	947	945	943	941
Ash	54	56	57	59
Crude protein	181	182	182	182
Neutral detergent fiber	141	139	137	135
Acid detergent fiber	50	49	49	48
Malate	1.5	3.8	6.1	8.4

<sup>1</sup>Malate = Rumalato (Norel & Nature Nutrition S.A., Madrid, Spain) containing (g/kg): 850 of E 296 DL-Malic acid; and 15 excipient (calcium carbonate and sodium bicarbonate).

<sup>2</sup>Contained (per kg): 8.500 IU of vitamin A, 2.250 IU of vitamin D3, and 6 mg of vitamin E (α-tocopherol).

**Table 2.** Effects of including different levels of malate in the concentrate of fattening lambs on voluntary intake (Exp.1)

Item	Malate treatment (g/kg of concentrate)				SEM <sup>1</sup>	Contrast ( <i>P</i> <)		
	0	3	6	9		L <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
Intake, g/d								
Concentrate DM	691	657	651	614	36.9	<b>0.04</b>	0.80	0.68
Straw DM	46	59	66	67	5.6	<b>0.02</b>	0.12	0.85
Total DM	737	715	717	681	20.1	<b>0.03</b>	0.43	0.76
Organic matter	697	684	672	639	19.0	<b>0.03</b>	0.43	0.76
Crude protein	127	123	121	114	6.6	<b>0.04</b>	0.73	0.69
NDF <sup>3</sup>	132	138	140	134	5.0	0.68	0.10	0.72
ADF <sup>4</sup>	55	60	62	60	2.4	0.09	<b>0.05</b>	0.47
Malate	1.8	3.4	5.0	6.2	0.16	<b>0.001</b>	0.12	0.66
Intake, % Total DMI <sup>5</sup>								
Concentrate	93.66	91.06	90.17	89.00	0.972	<b>0.009</b>	0.80	0.51
Straw	6.20	8.46	9.13	10.08	0.982	<b>0.002</b>	0.35	0.56
Malate	0.24	0.48	0.70	0.92	0.010	<b>0.001</b>	0.11	0.42

<sup>1</sup>SEM = standard error of the mean

<sup>2</sup>L. Q. C = linear, quadratic, and cubic effects, respectively

<sup>3</sup>Neutral detergent fiber

<sup>4</sup>Acid detergent fiber

<sup>5</sup>Dry matter intake

**Table 3.** Effects of including different levels of malate in the concentrate malate on performance of fattening lambs (Exp.1)

Item	Malate treatment (g/kg of concentrate)				SEM <sup>2</sup>	Contrast (P<)		
	0	3	6	9		L <sup>3</sup>	Q <sup>3</sup>	C <sup>3</sup>
Initial BW <sup>1</sup> , kg	14.46	14.85	14.37	14.65	0.341	0.95	0.80	0.14
Final BW, kg	23.45	23.43	23.43	23.44	0.364	0.99	0.95	0.98
ADG <sup>4</sup> , kg/d	0.292	0.309	0.301	0.302	0.0155	0.66	0.51	0.49
Feed conversion ratio <sup>5</sup>	2.71	2.48	2.51	2.30	0.163	<b>0.02</b>	0.95	0.33
Days at Slaughter								
Actual, d	31	30	31	31	2	0.93	0.74	0.52
For, 23 kg BW, d	31	30	30	30	2	0.63	0.16	0.93
Carcass Weight, kg	11.73	11.46	11.44	11.34	0.334	0.21	0.70	0.77
Carcass Yield, %	49.65	48.35	50.10	50.47	1.476	0.38	0.42	0.38

<sup>1</sup>Body weight<sup>2</sup>SEM = standard error of the mean<sup>3</sup>L, Q, C = linear, quadratic, and cubic effects, respectively<sup>4</sup>Average daily gain<sup>5</sup>Total daily dry matter intake/ADG

**Table 4.** Effects of including different levels of malate in the concentrate of growing lambs on voluntary intake (Exp.2)

Item	Malate treatment (g/kg of concentrate)				SEM <sup>1</sup>	Contrast (P<)		
	0	3	6	9		L <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
Intake, g/d								
Concentrate DM	1129	1027	1109	917	47	0.26	0.74	<b>0.05</b>
Straw DM	51	79	44	82	7	0.61	0.90	0.09
Total DM	1180	1106	1153	999	49	0.25	0.73	0.08
Organic matter	1117	1045	1087	940	46	0.18	0.68	0.28
Crude protein	207	189	203	170	10	0.25	0.73	0.21
NDF <sup>3</sup>	199	204	186	187	9	0.22	0.86	0.28
ADF <sup>4</sup>	80	87	74	81	4	0.82	0.99	0.20
Malate	2.5	5.1	7.4	9.0	0.24	<b>0.007</b>	0.14	0.66
Intake, % Total DMI <sup>5</sup>								
Concentrate	95.47	92.38	95.54	90.79	0.776	0.49	0.83	<b>0.003</b>
Straw	4.32	7.14	3.81	8.31	0.752	0.49	0.83	0.19
Malate	0.21	0.48	0.65	0.90	0.010	<b>0.002</b>	0.99	0.08

<sup>1</sup>SEM = standard error of the mean

<sup>2</sup>L, Q, C = linear, quadratic, and cubic effects respectively

<sup>3</sup>Neutral detergent fiber

<sup>4</sup>Acid detergent fiber

<sup>5</sup>Dry matter intake



**Table 5.** Effect of including different levels of malate in the concentrate on ruminal pH, concentrations of ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) and total volatile fatty acids (VFA), and individual VFA proportions in lambs

Item	Malate treatment (g/kg of concentrate)				SEM <sup>1</sup>	Contrast (P<)		
	0	3	6	9		L <sup>2</sup>	Q <sup>2</sup>	C <sup>2</sup>
Initial body weight (BW), kg	23.61	24.48	24.08	24.83	0.599	0.25	0.98	0.35
Final BW, kg	37.17	36.44	35.38	36.67	1.326	0.54	0.54	0.28
ADG <sup>3</sup> , kg/ d	0.287	0.285	0.269	0.291	0.019	0.69	0.49	0.41
Feed conversion ratio <sup>4</sup>	4.17	3.96	4.40	3.51	0.273	0.14	0.07	<b>0.05</b>
Concentrate conversion ratio <sup>5</sup>	3.99	3.68	4.23	3.22	0.262	0.06	0.21	<b>0.001</b>
pH	5.65	5.90	5.41	6.06	0.195	0.34	0.11	<b>0.01</b>
NH <sub>3</sub> -N, mg / 100mL	5.33	3.89	4.60	4.97	1.328	0.97	0.35	0.52
VFA, mM	136.3	147.8	178.3	148.9	11.95	<b>0.02</b>	<b>0.01</b>	0.14
Molar proportion, mol/100 mL								
Acetate	47.19	44.84	44.93	41.65	2.236	<b>0.02</b>	0.63	0.40
Propionate	44.14	42.73	42.43	42.14	3.156	0.52	0.74	0.91
Butyrate	3.99	10.69	12.06	13.95	3.090	<b>0.01</b>	0.29	0.66
Isobutyrate	0.32	0.35	0.29	0.31	0.069	0.45	0.39	0.40
Isovalerate	0.26	0.32	0.22	0.28	0.074	0.85	0.90	0.16
Valerate	2.46	1.75	1.54	2.21	0.476	0.81	<b>0.04</b>	0.83
BCVFA <sup>6</sup> , mM	0.79	0.95	0.93	0.81	0.191	0.96	0.29	0.92
C2:C3 <sup>7</sup>	1.1	1.1	1.1	1.0	0.05	0.28	0.57	0.58

<sup>1</sup>SEM = standard error of the mean<sup>2</sup>L, Q, C = linear, quadratic, and cubic effects, respectively<sup>3</sup>Average daily gain<sup>4</sup>Total daily dry matter intake (DMI)/ADG<sup>5</sup>Concentrate daily DMI/ADG<sup>6</sup>Branch-chained VFA, includes isobutyrate and isovalerate.<sup>7</sup>Acetate:propionate ratio

CAPÍTULO 6:  
**Discusión general**

Con la prohibición de los aditivos antibióticos como promotores de crecimiento (Reglamento 1831/2003/CE) parte de la investigación en nutrición animal se ha dirigido al estudio de otros aditivos autorizados, entre ellos los ácidos orgánicos, potencialmente utilizables para optimizar las raciones usadas en nutrición animal. En este contexto, el objetivo principal de esta tesis fue evaluar los efectos del malato como aditivo en raciones de cebo intensivo de corderos, en función de determinadas fuentes de almidón y de la dosis utilizada.

Dado que en los capítulos dedicados a los trabajos experimentales ya se han discutido de forma independiente los resultados obtenidos, el objetivo del presente apartado es realizar únicamente una breve discusión que ayude a ampliar la visión de conjunto y a integrar y/o contrastar algunos de los resultados que se han obtenido por separado en los experimentos realizados.

Tal como era de esperar, la suplementación con malato incrementó la concentración de malato en los piensos (Tabla 1) pero el nivel final de malato se vio condicionado no solo por la dosis de malato utilizada sino también por el contenido en malato de los ingredientes del concentrado.

**Tabla 1.** Concentración de malato (% de la MS) en los concentrados experimentales según los ingredientes utilizados y de la dosis de Rumalato utilizada en el concentrado.

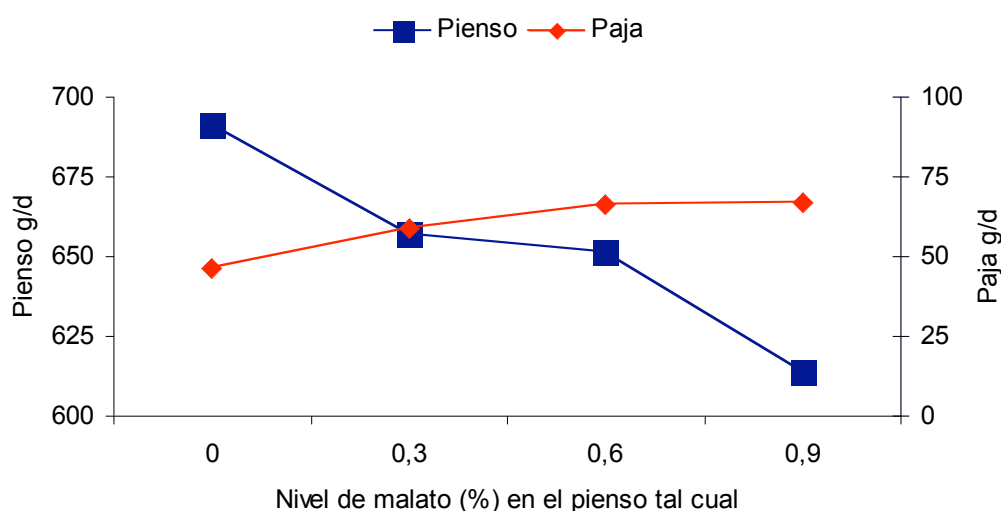
	Ingredientes base de los concentrados							
	Trigo (64%)		Mandioca (32%) cebada (36%)		Maíz (30%) cebada (30%) trigo (10%)			
Dosis <sup>1</sup> (%)	--	0,20	---	0,20	---	0,30	0,60	0,90
Malato (% MS)	0,29	0,47	0,20	0,36	0,15	0,38	0,61	0,84

<sup>1</sup>En materia fresca de pienso

Este resultado sugiere que sería de interés para una adecuada dosificación del malato conocer previamente su concentración en la ración base. Castillo et al. (2004) y Sniffen et al. (2006) consideran que la concentración de malato en la dieta base es importante en la determinación de la respuesta a la suplementación con malato y puede explicar en parte la variabilidad entre resultados de diferentes estudios.

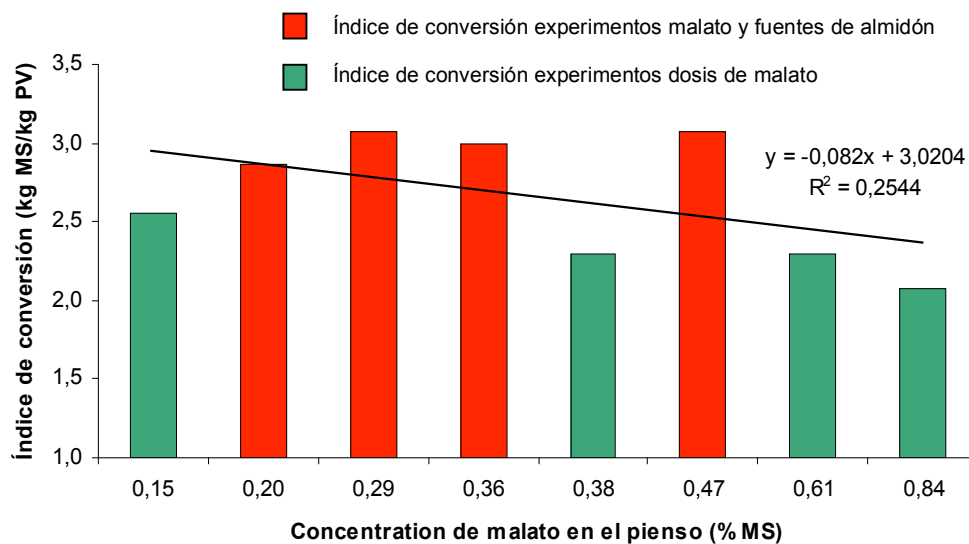
En los experimentos realizados, la suplementación con malato tuvo efectos variables sobre la ingestión. En el primer estudio (Exp. 1.1), en que se varió la fuente de almidón, la adición de malato aumentó la ingestión del pienso, así como la velocidad de crecimiento de los corderos, y esto fue más marcado en los que consumieron raciones a base de trigo en comparación con los que recibieron mandioca-cebada. Sin embargo, en la prueba de digestibilidad (Exp. 1.2), realizada bajo los mismos tratamientos experimentales, no varió la ingestión de concentrado, y se observó un aumento, ciertamente no significativo, pero no despreciable desde el punto de vista numérico (+23,6%) del consumo de paja en el lote con trigo y malato. En los dos experimentos realizados en el marco del segundo trabajo experimental (Exp. 2.1 y 2.2), se observó que al aumentar la dosis de malato disminuyó el consumo de concentrado, mientras que el consumo de paja aumentó en el primero de ellos (Exp. 2.1) y tendió a aumentar en el segundo (Exp. 2.2). En conjunto, al aumentar el malato, se redujo (Exp. 2.1) o tendió a reducirse (Exp. 2.2) el consumo total de alimento y, en consecuencia, mejoró el índice de conversión (Figura 2), aunque no varió la velocidad de crecimiento de los corderos. Estos últimos resultados sería similares a los encontrados con ionóforos que permiten mejorar los índices de conversión de alimentos sin alterar la GMD de los animales (Chalupa, 1980).

**Figura 1.** Efecto de la dosis de malato sobre la ingestión de pienso y de paja en corderos de cebo (Exp. 2.1).



Así pues se observa cierta inconsistencia en la respuesta a la suplementación con malato, de manera que en el primer trabajo experimental aumentaron la ingestión de concentrado y la velocidad de crecimiento, mientras que en el segundo se redujeron la ingestión y el índice de conversión, pero no mejoró el crecimiento. En la figura 3 se puede observar como el índice de conversión no evolucionó de la misma forma en los estudios realizados, aunque en conjunto el malato explica parte de la reducción del mismo.

**Figura 2.** Evolución del índice de conversión del concentrado en función de la concentración de malato en el mismo.



Algunos puntos a tener en cuenta, y que podrían contribuir a explicar en parte la disparidad de respuestas entre el primer trabajo experimental (malato y fuente de almidón) y el segundo (dosis de malato), tendrían que ver con la diversidad de ingredientes utilizados en cada caso para formular los concentrados, lo cual puede hacer variar la orientación de la fermentación ruminal, además del diferente nivel de malato que de por si aportan ya dichos ingredientes a la ración, como se ha comentado previamente. Tampoco es despreciable la posible influencia de la diferente forma química bajo la que se presentó el Rumalato® en uno y otro trabajo experimental. En efecto, bajo la misma denominación comercial de “Rumalato®”, y proveniente del mismo fabricante, en el primer estudio (Exp. 1.1 y 1.2) se dispuso de un producto constituido por 16% de malato disódico y 84% de malato cálcico, mientras que en el segundo estudio (Exp. 2.1 y 2.2) dicho producto contenía un 85% de E 296 DL-ácido málico. En el caso concreto de terneros en cebo intensivo,

Castillo et al. (2007) compararon los efectos de dos formas químicas de ácido málico (el ácido libre (DL- ácido málico) y la sal (malato disódico y malato calcio), no observando diferencias en los parámetros productivos durante el período de crecimiento, pero si alguna en el de finalización, en que el ácido málico (libre) se mostró más eficiente dado que mejoró a nivel numérico el crecimiento y el índice de conversión de los terneros.

En cuanto a la variación de la ingestión de alimentos y del comportamiento alimentario relacionado en particular con el consumo de pienso y paja, en respuesta a la adición de dosis crecientes de malato, dos factores podrían estar involucrados:

1) Teóricamente, el malato altera la fermentación ruminal incrementando la disponibilidad de energía, que a su vez puede modificar las preferencias de selección de pienso o de paja por parte de los animales (Provenza, 1995; Villalba y Provenza, 1997). Esta hipótesis es hasta cierto punto débil, porque en este estudio no se registró un aumento de la concentración de propionato. Sin embargo, es cierto que al aumentar la dosis de malato se observó un aumento de los AGV totales y un cambio en el perfil de dichos AGV.

2) La palatabilidad de los piensos con malato podría verse alterada. Según Carro y Ranilla (2002), este aditivo puede ocasionar problemas de palatabilidad y el consecuente descenso de la ingestión, tal como en la realidad se ha observado al aumentar las dosis de malato por encima de lo que suele ser habitual. Sin embargo, no se han encontrado datos en la literatura que indiquen un efecto positivo de malato sobre la ingestión, al menos en corderos, y que pudieran explicar el aumento de ingestión de MS observado en el primer experimento (Exp 1.1).

La respuesta cúbica observada en la ingestión de pienso en el último experimento (Exp. 2.2, corderas de 24 – 35 kg PV), derivada posiblemente del alto consumo de concentrado en el lote con 6 g de malato/kg, puede explicar las respuestas cúbicas del índice de conversión y del pH ruminal. También pondría de manifiesto que pequeños cambios, difíciles de predecir y/o de detectar, pueden hacer variar de forma notable los resultados obtenidos con el malato.

Según los datos de diversos autores (Martin et al 1999, Carro y Ranilla, 2003), la administración de malato contribuye a incrementar la producción de propionato y de AGV totales. Esto último se ha observado en el segundo estudio del presente trabajo, aunque no se ha podido confirmar el aumento del propionato. En cambio, si que observamos aumentos en el pH ruminal, un punto que puede ser realmente de

interés, especialmente en los sistemas intensivos de cebo que se utilizan en España. El malato incrementa la utilización de lactato por *Selenomonas ruminantium*, lo que, unido a la producción de CO<sub>2</sub> contribuye a aumentar el pH ruminal (Martin et al., 1999; Castillo et al., 2004). Sin embargo, el principal problema de su utilización puede ser su alto coste (Martin, 1998, Carro y Ranilla, 2002).

## Referencias

- Carro, M.D. and Ranilla, M.J. 2002. Aditivos antibioticos promotores del crecimiento: Situación actual y posibles alternativas. *Nutrición. Albéitar* 56, 46–49.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., 2003. Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains *Br. J. Nutr.* 89, 181–188.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso, M., Miranda, M., Hernández, J., 2004. Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 115, 101–116.
- Castillo, C., Benedito, J.L., Pereira, V., Vázquez, P., López Alonso, M., Méndez, J., Hernández, J., 2007. Malic acid supplementation in growing/finishing feedlot bull calves: Influence of chemical form on blood acid–base balance and productive performance, *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 222–235.
- Chalupa, W., Corbett, W., Brethour, J.R., 1980. Effects of monensin and amicloral on rumen fermentation. *J. Anim. Sci.* 51, 170–179.
- European Union, 2003. Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* 10/18/2003:L268/29–L268/43.
- Martin, S.A. 1998. Manipulation of Ruminal fermentation with Organic Acids: A Review. *J. Anim. Sci.* 76, 3123–3132.
- Martin, S.A., Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Hill, G.M., Williams, S.E., 1999. Effects of dl-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77, 1008–1015.
- Provenza, F.D., 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *J. Range Manage.* 48, 2.
- Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Danna, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa, M., Martin S.A., 2006. Effects of malic acid on

microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 127, 13–31

Villalba, J.J., F.D. Provenza, 1997. Preference for wheat straw by lambs conditioned with intraruminal infusions of starch. *Br. J. Nutr.* 77, 287–297.



CAPÍTULO 7:  
**Conclusiones**

Los experimentos realizados en la presente tesis doctoral, y bajo sus respectivas condiciones experimentales, permiten resaltar los siguientes puntos como principales conclusiones:

1. La utilización de malato al 0,2% del concentrado, mejoró el crecimiento de los corderos que recibieron concentrados a base de trigo, pero no el de los que recibieron mandioca-cebada.
2. Las interacciones observadas entre el malato y la fuente de almidón sugieren que las respuestas a la suplementación con malato pueden ser muy variables, dependiendo de la fuente de almidón que se incluya en el concentrado.
3. La utilización de un elevado nivel de mandioca (32%) no afectó el aumento de peso ni los índices de conversión de los corderos, lo que hace pensar que podría incluirse en los concentrados a niveles superiores a los habitualmente recomendados.
4. La utilización de malato a dosis superiores al 0,3% aumentó el consumo de paja y redujo el de concentrado, así como la ingestión total de MS y el índice de conversión, pero no mejoró el crecimiento de los corderos ni su peso en canal.
5. Las mejoras en la eficiencia de utilización del alimento se observaron incluso a altas dosis (0,9%) de malato, aunque este nivel de inclusión sería difícilmente competitivo desde el punto de vista económico.
6. Si bien el malato ha demostrado tener efectos positivos sobre algunos parámetros productivos, como el crecimiento o el índice de conversión, no es fácil predecir dichas mejoras ni relacionarlas con otros factores como la digestibilidad de los nutrientes, el pH ruminal o el perfil de ácidos grasos volátiles.