

## PRODUCCION DE AMONIACO RUMINAL *in vivo* E *in vitro* A PARTIR DE CINCO DIFERENTES FUENTES PROTEICAS

Héctor H. Li Pun\* y Larry D. Satter\*\*

Se realizaron dos experimentos, uno *in vivo* en ovinos y el otro *in vitro*, con el objetivo de medir la producción de amoníaco en el licor ruminal, como índice de la degradación proteica por los microorganismos ruminales, a partir de cinco diferentes fuentes proteicas. En el primer experimento, se utilizaron dos ovejas fistuladas ruminalmente, en un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial 2 x 5 x 2 x 9 (animales x fuentes proteicas x ensayos x tiempos de muestreo). Se utilizaron cinco proteínas de variada solubilidad: harina de pescado, harina de soya, harina de linaza, harina de carne y caseína. Se midieron los cambios en las concentraciones ruminales de amoníaco a través de un período de seis horas para determinar las curvas de producción de amoníaco y servir de índices de degradación proteica en el rumen. La caseína produjo cambios más grandes en las concentraciones de amoníaco que las otras fuentes ( $P < .01$ ). La harina de linaza, la harina de soya y la harina de carne fueron degradadas en menor grado. La harina de pescado, aparentemente, fue la fuente proteica menos degradada, pues produjo cambios negativos en la concentración de amoníaco ruminal, en relación con el tiempo de infusión. En el segundo experimento, se realizaron una serie de incubaciones de las fuentes proteicas utilizadas en el experimento, *in vivo*, utilizando licor ruminal proveniente de una vaca fistulada ruminalmente. Se utilizó un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial 5 x 3 x 2 x 3 (fuentes proteicas x ensayos x repetición x tiempo de muestreo). Se observaron diferencias en la producción de amoníaco sólo a partir de las 12 horas de incubación. A las 24 horas de incubación, se observaron diferencias notables en la producción de amoníaco, que indicaron que probablemente la caseína fue la fuente proteica más degradada, seguida de la harina de soya, la harina de linaza y la harina de carne. Aparentemente, la harina de pescado fue la fuente menos degradada. Se concluyó de ambos experimentos, que las respuestas obtenidas fueron similares, siendo la caseína la fuente más degradada y la harina de pescado la menos degradada. La harina de soya, harina de linaza y harina de carne mostraron valores intermedios con respecto a las otras dos fuentes proteicas.

La proteólisis es uno de los procesos más importantes que ocurren en el rumen. En condiciones normales, la mayor parte de la proteína dietética es degradada por la población microbiana del rumen a péptidos, luego a aminoácidos, siendo el amoníaco el producto final. Este compuesto sirve de sustrato para la síntesis de proteína microbiana, en consecuencia, la mayor parte de la proteína que llega al abomaso es de origen microbiano (Nolan y col., 1973). La cantidad y calidad de la proteína disponible para la digestión en

\* Ph. D., Asesor Pecuuario IDIAP - Centro Experimental de Gualaca, Chiriquí, República de Panamá.

\*\* Ph. D., Profesor Principal. Department of Dairy Science. The University of Wisconsin, Madison, U.S.A. 53706.

el abomaso y duodeno, depende principalmente del grado de la proteólisis en el rumen. Existen evidencias de que las proteínas de baja solubilidad podrían ser utilizadas más eficientemente por los rumiantes, debido a su menor tasa de degradación en el rumen (Preston y Willis, 1974; Li Pun y Satter, 1975).

Las estimaciones de las tasas de degradación son extremadamente difíciles, debido al problema existente para separar las proteínas provenientes del alimento, de aquellas de origen microbiano. Se han probado diferentes métodos de estimación de la proteína microbiana, tales como el uso de ácidos nucleicos (Mc Allan y Smith, 1969) y la incorporación de isótopos a la proteína microbiana (Walker y Nader, 1968; Beever y col., 1974). Sin embargo, estos métodos son muy laboriosos y algunos no son muy precisos. Una de las formas de conocer la degradación relativa de una proteína es determinando la concentración de nitrógeno soluble en el licor ruminal de animales a los que se les suministra una fuente proteica específica.

El objetivo del presente trabajo fue el de determinar la producción de amoníaco, como índice de la degradación proteica por acción microbiana a partir de cinco fuentes proteicas, utilizando dos métodos diferentes:

- a) *In vivo*, utilizando ovejas fistuladas,
- b) *In vitro*, utilizando fluido ruminal de vacas.

## MATERIALES Y METODOS

### A) Experimento *in vivo*

Se utilizaron dos ovejas hembras "Black-face", adultas, fistuladas ruminalmente, en un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial 2 x 5 x 2 x 9 (animales x fuentes proteicas x ensayos x tiempos de muestreo), en el cual se evaluaron cinco fuentes proteicas: Harina de pescado, harina de soya, harina de linaza, harina de carne y caseinato de sodio.

Las ovejas fueron alimentadas diariamente con 1.5 kg de una ración básica, cuya composición se muestra en el Cuadro 1. Se proveyó agua a libre consumo. Dieciseis horas antes de iniciar la infusión de las fuentes proteicas, se retiró el alimento y, una hora antes, el agua. Cada ensayo consistió en la infusión de 12 g de nitrógeno provenientes de una de las fuentes proteicas a las que se les adicionó una cantidad de almidón equivalente para estandarizar la cantidad de carbohidratos fermentables de las cinco fuentes proteicas. En consecuencia, las fuentes proteicas fueron estandarizadas de acuerdo con su disponibilidad de nitrógeno y de carbohidratos fermentables. La mezcla de la fuente proteica y el almidón se disolvió en un litro de agua a 38°C y la suspensión se vertió a través de la cánula ruminal.

Se tomaron muestras de 20 ml de fluido ruminal a través de la cánula, mediante el uso de jeringas desechables de plástico, conectadas a un tubo de plástico rígido. Las muestras se tomaron aproximadamente del mismo lugar a 20 cm de la fístula en el saco ventral del rumen. Se muestreó previamente a la infusión proteica y a intervalos de 30 minutos por las primeras tres horas y de 60 minutos hasta completar seis horas de muestreo.

Las muestras fueron conservadas añadiendo dos ml de una solución de ácido sulfúrico al 50 por ciento. Luego se filtraron a través de una capa doble de gasa. El filtrado se centrifugó a 19,800 gravedades por 15 minutos. Se determinó la concentración de nitró-

geno amoniacal por el método de destilación a vapor (Bremner y Keeney, 1965).

**Cuadro 1. Composición de la dieta básica ofrecida en el experimento *in vivo*.**

Ingredientes	%
Alfalfa, harina de	14.8
Remolacha, pulpa de	14.8
Maíz, grano	66.1
Fosfato dicálcico	1.3
Sales minerales	0.5
Sulfato de sodio	0.3
Aglutinante	1.0
Proteína Cruda Total, %	11.8

#### B) Experimento *in vitro*

Se trabajó con las mismas fuentes proteicas del experimento *in vivo* (parte A), en un diseño irrestrictamente al azar con arreglo factorial 5 x 3 x 2 x 3 (fuentes proteicas x ensayos x repeticiones x tiempo de muestreo). Las muestras fueron incubadas en duplicado durante 6, 12 ó 24 horas y se realizaron tres ensayos similares.

Se incubó 1 g de proteína cruda de cada una de las cinco fuentes proteicas, añadiendo almidón de maíz en cantidades suficientes para estandarizar la cantidad de sustrato fermentable en cada frasco de incubación (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Cantidad de fuente proteica y almidón de maíz añadida en los frascos de incubación en el experimento *in vitro*.**

Fuente Proteica	Cantidad de Sustrato por frasco	Cantidad de almidón de maíz por frasco
Pescado, harina	1.66	1.50
Soya, harina	2.27	0.84
Linaza, harina	2.94	0.42
Caseína	1.08	1.50
Carne, harina	2.00	1.50

Se añadió 40 ml de fluido ruminal de una vaca fistulada, a cada uno de los frascos de incubación de 125 ml, previa filtración a través de una capa de gasa.

A cada frasco se le añadió 30 ml de una solución tampón (Cuadro 3) y luego se les selló con tapones de hule, provistos con válvulas Bunsen. Los frascos fueron incubados en un baño maría con agitación continua a 38°C por 6, 12 ó 24 horas. Se detuvo la fermentación añadiendo 1 ml de ácido sulfúrico (50% v/v) a cada frasco. Después de la incubación, los contenidos de cada frasco se filtraron a través de una capa de gasa y se centrifugaron a 17,000 gravedades por 15 minutos.

**Cuadro 3. Composición de la solución tampón utilizada en el experimento *in vitro*.**

Ingredientes	g/l
Fosfato de potasio (monobásico)	18.90
Fosfato de potasio (dibásico)	8.40
Cloruro de sodio	1.68
Sulfato de sodio	1.40
Sulfato de magnesio (anhidro)	0.17
Cloruro de calcio (anhidro)	0.17

Las determinaciones de nitrógeno amoniacal se realizaron por destilación, según el método de Kjeldahl (AOAC, 1970), utilizando óxido de magnesio pesado como catalizador.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### A) Experimento *in vivo*

La concentración de nitrógeno amoniacal obtenida de las cinco fuentes proteicas se muestra en el Cuadro 4 y en la Figura 1. Se observó que la concentración de amoníaco ruminal a partir del momento de la infusión, varió significativamente ( $P < .01$ ). Cuando se usó caseína, ocurrió el cambio más grande en la concentración de amoníaco ruminal ( $P < .05$ ). La harina de linaza produjo una concentración de amoníaco significativamente mayor que la harina de pescado ( $P < .05$ ), pero no diferente a la producida por la harina de soya ó la harina de carne ( $P > .05$ ).

Cuadro 4. Cambios <sup>a</sup> en la concentración de N-NH<sub>3</sub> (mg/100 ml) con respecto al tiempo de infusión en el fluido ruminal de ovinos alimentados intrarruminalmente con cinco diferentes fuentes proteicas.

Fuente Proteica Tiempo Post-infusión (h)	Harina de Pescado	Harina de Soya	Harina de Linaza	Caseína	Harina de Carne
	mg/100 ml				
0.5	2.59	5.59	5.34	5.01	2.59
1.0	4.14	8.67	9.22	12.75	5.29
1.5	2.78	10.33	12.40	13.77	6.70
2.0	0.35	12.71	13.57	18.02	11.10
2.5	-3.40	14.84	14.08	24.41	9.51
3.0	-5.19	11.59	13.42	24.54	8.22
4.0	-3.64	8.09	11.67	27.16	5.38
5.0	-2.15	0.59	9.34	37.71	3.33
6.0	-1.00	-0.93	8.98	33.67	0.26
$\bar{X}$	-0.39 c	7.94 b,c	10.89 b	21.89 a	5.82 b,c

<sup>a</sup> Promedio de cuatro observaciones.

a, b, c Promedios que tienen la misma letra no son diferentes significativamente ( $P > .05$ ).

Se encontraron variaciones considerables en las concentraciones de amoníaco dentro de tratamientos. Es de importancia conocer las curvas de producción de amoníaco cuando se proveen diferentes fuentes proteicas, especialmente si se les asocia con fuentes de nitrógeno no proteico. Por ejemplo, los compuestos que producen picos altos de producción de amoníaco en etapas tempranas no serían tan útiles como otros que liberen el amoníaco más lentamente. Existen algunas evidencias en la literatura en ese sentido (Ørskov, Fraser y Coarse, 1970; Preston, 1974; Li Pun y Satter, 1975). Seoane y Moore (1964) observaron en novillos, que la alimentación con harina de soya, resultó en concentraciones de amoníaco 2.5 veces mayor a las dos horas después de haber recibido el suplemento, que cuando se proveyó harina de pescado.

Los cambios relativos en la concentración de amoníaco causado por proteínas de diferente solubilidad están en el rango de lo encontrado por varios autores (McDonald, 1952; Chalmers y col., 1954; McDonald y Hall, 1957; El Shazly, 1958; Chalmers y Marshall, 1964; Mangan, 1972).

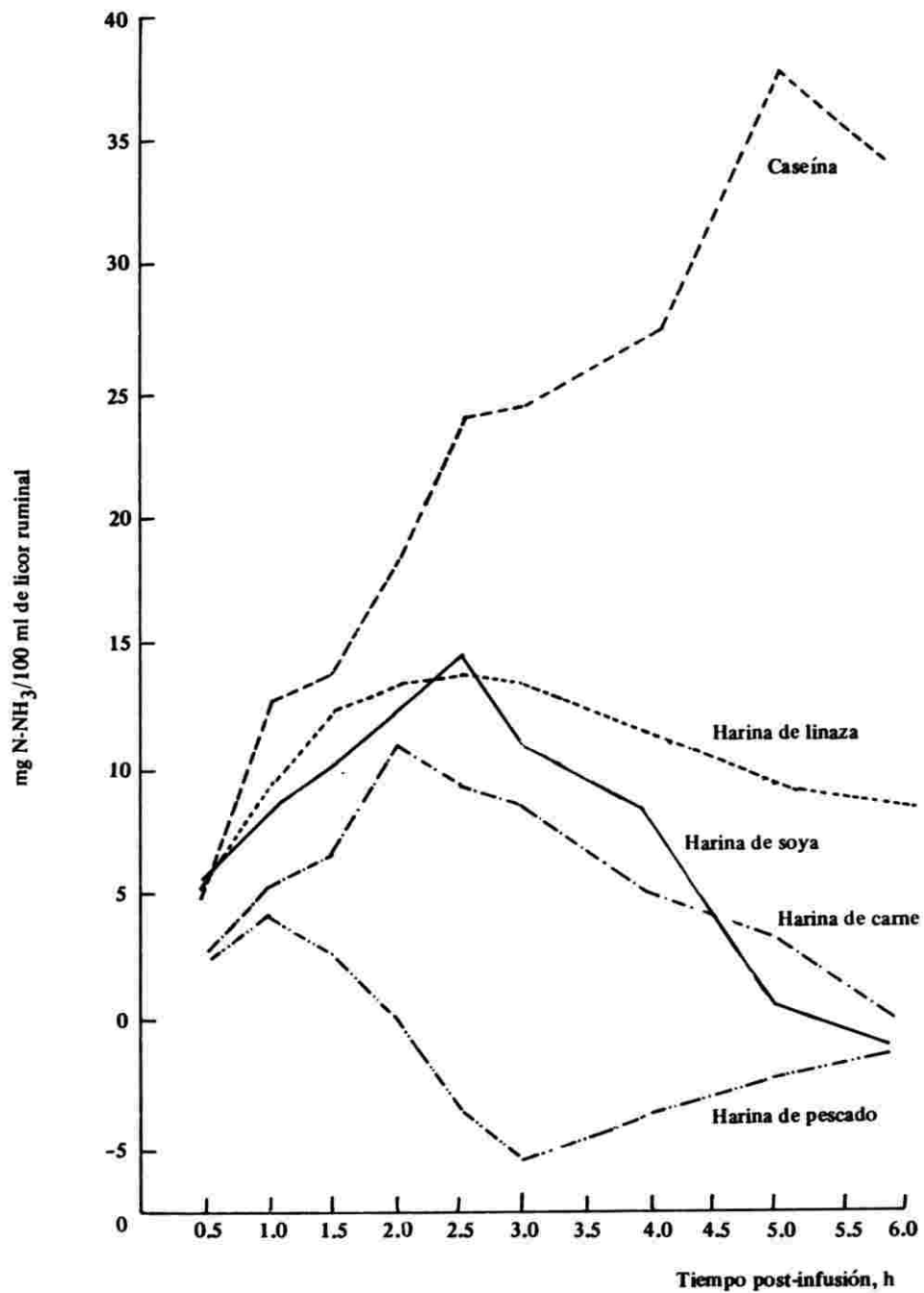


Figura 1. Producción de amoníaco de cinco diferentes fuentes proteicas después de su infusión por vía ruminal en ovinos.

El retardo en la aparición del pico de la curva de concentración de amoníaco luego de la infusión de caseína (Figura 1) pudo ser debido a la cantidad relativamente grande de almidón que se administró junto con la caseína. Sin el almidón, se esperaría un pico más alto y más temprano, en el caso de la caseína, ya que el almidón es una fuente de energía de disponibilidad alta y rápida para los microorganismos ruminales, por lo que cuando éstos utilizan el almidón, usan también el amoníaco para la síntesis microbiana. En consecuencia, la concentración del amoníaco en el rumen disminuye en presencia de una alta disponibilidad de almidones. La mayor parte del almidón, probablemente fue utilizado de dos a cuatro horas después de la infusión, luego de las cuales, la absorción de amoníaco por los microorganismos decrece, y el amoníaco se acumularía. Esta tendencia ha sido observada por otros investigadores (Lewis y McDonald, 1958; El Shazly, 1958).

El Shazly (1958) observó que la producción de amoníaco a partir de la caseína alcanzó su pico a las siete horas después de la infusión. Este estuvo precedido de un pico más pequeño a las cuatro horas. En el mismo experimento, la harina de carne, la harina de linaza y la harina de pescado produjeron un pico de producción de amoníaco a las tres horas.

Los patrones de producción de amoníaco en el presente experimento concuerdan con los de la literatura. La harina de pescado produjo muy poco amoníaco, indicando que probablemente fue muy poco degradada en el rumen. Existen ciertas evidencias de que la solubilidad proteica y el rendimiento animal están relacionados (Ørskov, Fraser y McDonald, 1970; Li Pun y Satter, 1975). Esto se debe posiblemente a una menor proteólisis en el caso de proteínas de baja solubilidad (Chalmers, 1964; Whitelaw y col., 1964; Hume, 1974). Como los métodos para evaluar la degradación proteica son muy complicados y de difusión limitada, la producción de amoníaco (que refleja la solubilidad proteica) puede ser un indicador de la tasa relativa de degradación proteica. Se debe conocer, sin embargo, que la concentración de amoníaco en un momento dado será dependiente de: (1) la tasa de desaminación de aminoácidos, (2) absorción del amoníaco por los microorganismos, (3) absorción del amoníaco a través del retículo-rumen, (4) pasaje del amoníaco al abomaso y al resto del tubo gastrointestinal, y (5) la recirculación del amoníaco y urea vía saliva y a través de la pared ruminal (Chalupa, 1972). De estos factores, el primero es el más importante cuando se utilizan dietas de contenido proteico medio o alto. En consecuencia, la concentración del amoníaco en el fluido ruminal puede servir como índice de degradación relativa de fuentes proteicas por los microorganismos ruminales.

En el presente experimento, las grandes diferencias en la producción de amoníaco, reafirman la necesidad de considerar las características de las proteínas para evitar la degradación por acción microbiana. Cuando se usan proteínas de alta calidad como suplemento de raciones para rumiantes, no solamente es importante la composición de aminoácidos en la proteína, sino también la característica de la proteína para escapar a la degradación microbiana. Estas consideraciones han sido demostradas por varios investigadores con diferentes tipos de animales y diferentes suplementos proteicos (Miller, 1973; Faichney, 1974; Li Pun y Satter, 1975).

## B) Experimento *in vitro*

Los incrementos en la producción de amoníaco, sobre el control de cero horas se observan en el Cuadro 5 y en la Figura 2.

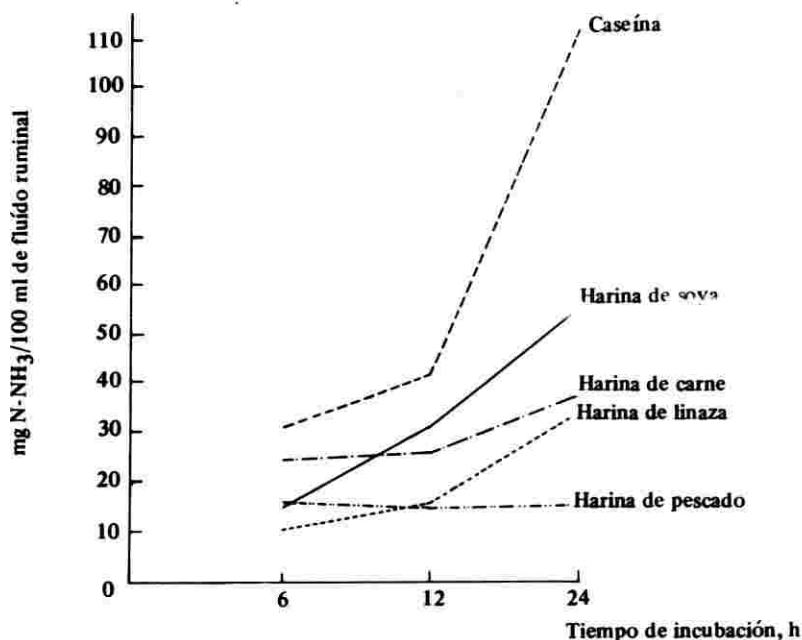
**Cuadro 5. Producción de amoníaco <sup>a</sup> a partir de cinco fuentes proteicas incubadas en licor ruminal *in vitro*.**

Fuente Proteica	Harina de Pescado	Harina de Soya	Harina de Linaza	Caseína	Harina de Carne	E. S.
Tiempo de incubación (h)	mg N-NH <sub>3</sub> /100 ml de fluido ruminal					
6	16.31	15.33	10.55	20.61	24.35	± 1.08
12	15.58	31.16	16.32	42.01	25.39	± 2.04
24	15.70	56.67	33.37	111.01	37.41	± 6.43

<sup>a</sup> Promedio de seis observaciones

Después de seis horas de incubación, no se observaron diferencias significativas en la producción de amoníaco entre las cinco diferentes fuentes proteicas. Sin embargo, después de las 12 y 24 horas, se pudo observar que la caseína y la harina de soya produjeron más amoníaco que las otras fuentes. Similarmente las muestras que contenían caseína produjeron más amoníaco que aquellas que contenían harina de soya, tanto a las 12 como a las 24 horas de incubación. Adicionalmente la diferencia en producción de amoníaco entre la harina de pescado y la harina de carne, fue significativa, ( $P < .05$ ) sólo después de 24 horas de incubación.

**Figura 2**



**Figura 2. Producción de amoníaco a partir de cinco fuentes proteicas incubadas en licor ruminal.**



La falta de diferencias significativas en la producción de amoníaco entre las cinco fuentes proteicas a las seis horas se puede deber a la adición de almidón. Está demostrado que el almidón reduce la concentración de amoníaco en el licor ruminal al incrementarse la absorción del nitrógeno soluble por los microorganismos ruminales (Head, 1953; El Shazly, 1958; Lewis y McDonald, 1958). Este puede haber sido el caso en el presente trabajo. Posteriormente, al incrementarse el período de incubación y consumirse los sustratos, el amoníaco se acumuló en el medio. Después de 24 horas de incubación, existieron diferencias en la cantidad de amoníaco producido a partir de las diferentes fuentes proteicas.

El orden del grado relativo de degradación proteica *in vitro*, concuerda con los resultados del experimento *in vivo*. En este experimento, aparentemente la harina de carne y la de linaza fueron degradadas similarmente. Se debe reconocer que los resultados de experimentos *in vivo* e *in vitro*, no necesariamente deben ser similares. En la situación *in vitro*, no existe recirculación de nitrógeno, ni movilización de los productos de la fermentación. En consecuencia, los estimados de degradación proteica de las fuentes en estudio podrían ser diferentes.

### CONCLUSIONES

1. Los resultados del estudio efectuado en ovinos, sugieren que la harina de pescado y la harina de carne fueron menos degradados que la harina de soya, harina de linaza y caseína.
2. Los estudios *in vitro* sugieren que luego de 24 horas de incubación la caseína y la harina de soya son extensamente degradadas; la harina de carne y la harina de linaza en menor grado, y la harina de pescado es escasamente degradada.

### ABSTRACT

Two experiments were carried out to measure ruminal ammonia production from five different protein sources, as an index of protein degradation by rumen microbes. In the first experiment, two rumen fistulated ewes were used in a 2 x 5 x 2 x 9 (animals x protein sources x trials x sampling times) factorial design. Five proteins of variable solubilities were used: fishmeal, soybean meal, linseed meal, meat scraps and casein. Changes in ruminal ammonia concentration were measured during a six-hour period to determine ammonia concentration curves which were used as indicators of the relative degradation of the protein sources in the rumen. Casein produced greater changes in ammonia concentration than the other protein sources ( $P < .01$ ). Linseed meal, soybean meal and meat scraps were degraded to a lesser extent. Fishmeal, apparently was the least degraded source, because it produced negative changes in ruminal ammonia concentrations in relation to the time of infusion. In the second experiment, a series of incubation trials with rumen liquor from a fistulated cow, were conducted with the same protein sources utilized in the *in vivo* experiment. A 5 x 3 x 2 x 3 (protein sources x trials x repetitions x incubation times) factorial design was utilized. There were significant differences in ammonia production from the different sources starting after 12 hours of incubation. At the 24 hours incubation period there were significant differences in ammonia production, this indicating that probably casein was the most degraded protein, followed by soybean meal, linseed meal and meat scraps. Apparently, fish

meal was the least degraded protein. From both experiments, the responses were similar, it was concluded that being casein the most degraded protein source and fish meal the least degraded. Soybean meal, linseed meal and meat scraps showed intermediate values in relation to the other two protein sources.

## AGRADECIMIENTO

Al Dr. Manuel E. Ruiz e Ing. Danilo Pezo, del CATIE y al Lic. Manuel H. Ruiloba del IDIAP, por sus valiosas sugerencias en la revisión del manuscrito.

## BIBLIOGRAFIA

- ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC, 11th ed. Washington, D. C. George Banta Company, Inc. 1970. 1,015 p.
- BEEVER, D. E.; HARRISON, D.C.; THOMSON, D.J.; y OSBOURN, S.B. A method for the estimation of dietary and microbial protein in duodenal digesta of ruminants. *British Journal of Nutrition* 32:99. 1974.
- BREMNER, J.M. y KEENEY, D.R. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Analytical Acta* 31:485. 1975.
- CHALMERS, M.I.; CULHBERSON, D.P. y SYNGE, R.L. Ruminal ammonia formation to the protein requirements of sheep. II. Comparison of casein and herring meal supplements. *Journal of Agricultural Science* 44:254. 1956.
- \_\_\_\_\_ y MARSHALL, S.B.M. Ruminal ammonia formation in relation to the utilization of groundnut meal and herring meal as protein sources for milk production. *Journal of Agricultural Science* 63:277. 1964.
- CHALUPA, W. Metabolic aspects of nonprotein nitrogen utilization in ruminant animals. *Federation Proceedings* 31:1152. 1972.
- EL SHAZLY, K. Studies on the nutritive value of some common Egyptian feeding stuffs. 1. Nitrogen retention and ruminal ammonia curves. *Journal of Agricultural Science* 51:149. 1958.
- \_\_\_\_\_ y HUNGATE, R.E. Method for measuring diamino-pimelic acid in total rumen contents and its application to the estimation of bacterial growth. *Applied Microbiology* 14:27. 1966.
- FAICHNEY, G.J. Effects of formaldehyde treatment of casein and peanut meal supplements on amino acids in digesta and plasma of lambs and sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 25:583. 1974.

- HEAD, M.J. The effect of quality and quantity of carbohydrate and protein in the ration of sheep on the digestibility of cellulose and other constituents of the ration with a note on the effect of adding vitamins of the B-complex on the digestibility and retention of the nutrients of a hay ration. *Journal of Agricultural Science* 43:281. 1953.
- HUME, I.D. The proportion of dietary protein escaping degradation in the rumen of sheep fed on various protein concentrates. *Australian Journal of Agricultural Research* 25:155. 1974.
- LEWIS, D. y McDONALD, I.W. The inter-relationships of individual proteins and carbohydrates during fermentation in the rumen of the sheep. The fermentation of casein in the presence of starch or other carbohydrate materials. *Journal of Agricultural Science* 51:108. 1958.
- LI PUN, H.H. y SATTER, L.D. Effect of protein source on plasma free amino acid concentration in ruminants. *Journal of Dairy Science* 58:778 (abstract). 1975.
- MANGAN, J.L. Qualitative studies on nitrogen metabolism in the rumen. The rate of proteolysis of casein and ovoalbumin and the release and metabolism of free amino acids. *British Journal of Nutrition* 27:261. 1972.
- McALLAN, A.B. y SMITH R. H. Nucleic acid metabolism in the ruminant. Determination of nucleic acid in digesta. *British Journal of Nutrition* 23:671. 1969.
- McDONALD, I.W. The role of ammonia in ruminal digestion of proteins. *Biochemistry Journal* 51:86. 1952.
- \_\_\_\_\_ y HALL, R.J. The conversion of casein into microbial proteins in the rumen. *Biochemistry Journal* 67:400. 1957.
- MILLER, E.L. Evaluation of foods as sources of nitrogen and amino acids. *Proceedings of the Nutrition Society* 32:79. 1973.
- NOLAN, J.V.; NORTON, B.W. y LENG, R. A. Nitrogen Cycling in sheep. *Proceedings of the Nutrition Society* 32:93. 1973.
- ØRSKOV, E.R.; FRASER, C. y McDONALD, I.W. The effect on protein utilization of feeding different protein supplements via the rumen or via the abomasum in young growing sheep. *British Journal of Nutrition* 24:803. 1970.
- PRESTON, T.R. y WILLIS, M.B. *Intensive beef production*. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, England. 1974.
- SEOANE, J.R. y MOORE, J.E. Effects of fishmeal on nutrient digestibility and rumen fermentation of high-roughage rations for cattle. *Journal of Animal Science* 29:972. 1969.
- WALKER, D.J. y NADER, C.J. Method for measuring microbial growth in rumen content. *Applied Microbiology* 16:1124. 1968.

**WHITELAW, F.G.; PRESTON, T.R. y McLEOD, N.A. The relative value of four different fish meal products as the mayor protein source in the diet. Animal Production 6:25. 1964.**