

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA AGRONÒMICA
I DEL MEDI NATURAL



**HACIA UNA NUTRICIÓN DE PRECISIÓN EN
AVICULTURA:
EVOLUCIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE
AMINOÁCIDOS EN EL CUERPO DE POLLOS DE
ENGORDE ALIMENTADOS CON UNA DIETA LIBRE
DE NITRÓGENO**

TRABAJO FINAL DE MÁSTER EN:
Máster en Ingeniería Agronómica

ALUMNA: Inés Carolina Esteve Ambrosio

TUTORES/AS:
María Cambra López
Juan José Pascual Amorós

Curso Académico: 2020-2021
Valencia, julio de 2021



HACIA UNA NUTRICIÓN DE PRECISIÓN EN AVICULTURA: EVOLUCIÓN DE LAS PÉRDIDAS DE AMINOÁCIDOS EN EL CUERPO DE POLLOS DE ENGORDE ALIMENTADOS CON UNA DIETA LIBRE DE NITRÓGENO

RESUMEN

En el camino hacia la intensificación sostenible en ganadería, la nutrición de precisión debe asegurar una dieta lo más ajustada a las necesidades de los animales. Todo alimento que no sea aprovechado por el animal se elimina, produciendo pérdidas económicas y medioambientales. La proteína es uno de los nutrientes con mayor coste de la dieta y de los que causa mayores problemas en el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo es conocer la evolución de las pérdidas de aminoácidos en el cuerpo de pollos de engorde alimentados con una dieta libre de nitrógeno (N-free). Esta información es necesaria para determinar el momento adecuado para eutanasiar a los animales para determinar de forma precisa las necesidades netas de aminoácidos para mantenimiento. Definir con exactitud estas necesidades contribuirá a ampliar la información necesaria para diseñar una proteína 100% digestible y aprovechable para pollos de engorde. Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Ciencia y Tecnología Animal (CITA) ubicado EN Segorbe (Castellón) y la Universitat Politècnica de València (UPV).

Se utilizaron 25 pollos alimentados desde el primer día con un pienso comercial, durante 10 días. Transcurrido ese tiempo se realizó el pesaje e inicio de la dieta N-free ad libitum durante 7 días. Los días 0, 2, 4 y 7, se pesaron y sacrificaron 5 pollos cada día. Se determinó la materia seca, proteína bruta y aminoácidos en el cuerpo entero de cada animal, para el cálculo de las pérdidas de aminoácidos en el cuerpo cuando el animal recibe una dieta adecuada en energía. Los análisis determinaron que la dieta N-free provoca una disminución de la ingestión en comparación a la realizada por un pollo de esta estirpe de forma habitual. Además, se confirma que los aminoácidos limitantes en esta especie son la metionina, lisina, treonina, valina e isoleucina. Se pudo definir un punto de partida para la determinación de las necesidades netas de aminoácidos en la fase de mantenimiento, tras dos días de adaptación, entre el día 2 y 4 después de estar alimentados con una dieta N-free.

Palabras clave: Ganadería de precisión, ganadería sostenible, proteína, nitrógeno, broiler.

Alumna: Inés Carolina Esteve Ambrosio

Tutores/as: María Cambra López y Juan José Pascual Amorós

Valencia, Julio de 2021

TOWARDS PRECISION POULTRY FEEDING: AMINO ACID LOSSES IN THE BODY OF BROILER CHICKEN FED A NITROGEN-FREE DIET

ABSTRACT

On the way to sustainable intensification in livestock farming, precision nutrition must ensure a diet that best suits the needs of the animals. Nutrients not used by the animal are eliminated, producing economic and environmental losses. Protein is one of the costliest nutrients in diets and is responsible for environmental problems.

The objective of this work was to study the evolution of amino acid losses in the body of broilers fed a nitrogen-free diet (N-free). This information is necessary to determine the appropriate time to euthanize the animals to accurately determine the net amino acid requirements for maintenance. Accurately defining these needs will help to expand the information needed to design a 100% digestible and usable protein for broilers. This study was carried out at the Animal Science and Technology Research Center (CITA) located in Segorbe (Castellón) and the Polytechnic University of Valencia (UPV).

For this experiment, a total of 25 chickens were used. These animals were fed a commercial diet for the first ten days after hatching. On day 10 the animals were weighed and then started the N-free ad libitum diet for 7 days. On days 0, 2, 4 and 7, 5 chickens were weighed and slaughtered. The dry matter, crude protein and amino acids in the entire body of each animal were determined to calculate the losses of amino acids in the body when the animal receives a diet with an adequate energy level. The chemical analysis determined that the N-free diet causes a decrease in ingestion compared to a chicken from the same breed fed with a commercial diet. Furthermore, it was corroborated that the limiting amino acids in this species are methionine, lysine, threonine, valine and isoleucine. Moreover, it was possible to define a starting point for the determination of net needs of amino acids in the maintenance phase, after two days of adaptation, between day 2 and 4 after being fed an N-free diet.

Keywords: Precision farming, sustainable farming, protein, nitrogen, broiler.

Student: Inés Carolina Esteve Ambrosio

Supervisors: María Cambra López and Juan José Pascual Amorós

Valencia, July 2021

Agradecer a mi familia y amigos por haberme apoyado y animado en toda esta etapa para llegar hasta aquí. A mis tutores Juanjo y María, por su tiempo dedicado, la enseñanza que me han dejado y formarme profesionalmente. A mis profesores Luis y Javier que han tenido la paciencia para ayudarme a llevar con éxito mi experimental. A mi compañera y amiga Cati, que no ha dejado que me rindiese.

Y a todas esas personas que han aportado un granito de arena a cada una de las líneas de este trabajo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO	4
3. MATERIALES Y MÉTODOS	5
3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO	5
3.2. ANIMALES	5
3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL	5
3.4. DIETA N-FREE.....	6
3.5. ANÁLISIS QUÍMICOS.....	7
3.5.1. Determinación de materia seca (MS)	7
3.5.2. Determinación de proteína bruta (PB)	7
3.5.3. Determinación de aminoácidos totales y azufrados.....	7
3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	8
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
3.1. COMPORTAMIENTO DE LOS POLLOS DE ENGORDE DURANTE EL SUMINISTRO DE LA DIETA N-FREE	9
3.2. PÉRDIDAS DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS EN EL CUERPO ENTERO	10
3.3. NECESIDADES NETAS DE MANTENIMIENTO	14
4. CONCLUSIÓN	16
5. BIBLIOGRAFÍA.....	17
6. ANEJOS	20

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Efecto de la dieta N-free durante los días 0, 2, 4 y 7 en ingesta de alimento (g/día) y peso corporal (g), en pollos de engorde de 10 días de vida. (Las columnas muestran la ingesta de alimento por día y los puntos muestran la media de peso del cuerpo entero en los días de pesaje/sacrificio. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$; Peso, $n=5$) **10**
- Figura 2.** Requerimientos diarios de proteína bruta en g por día, según el día de inicio de la valoración. (Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (PB, $n=5$)..... **11**
- Figura 3.** Requerimientos de lisina en mg por día, según el día de la valoración. (Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (Lisina, $n=5$) **12**
- Figura 4.** Requerimientos de arginina, treonina, cisteína y metionina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (aminoácido, $n=5$). **13**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Calendario de la prueba experimental	6
Tabla 2. Composición de la dieta experimental libre de nitrógeno ¹	7
Tabla 3. Comparación de las necesidades netas (relativas a lisina) de mantenimiento obtenidas en este estudio para los principales aminoácidos con las necesidades totales digeribles a nivel ileal por diferentes autores.	15

ANEJOS

Anejo I. Requerimientos de histidina, isoleucina, leucina y valina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración. (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P<0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (aminoácido, $n=5$).	20
Anejo II. Requerimientos de ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y tirosina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración. (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P<0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (aminoácido, $n=5$).	21
Anejo III. Requerimientos de alanina, fenilalanina, glicina y serina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración. (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P<0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (aminoácido, $n=5$).	22

ABREVIATURAS

IC: Índice de conversión

N: Nitrógeno

PB: Proteína bruta

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la producción de carne de pollo supone una de las industrias ganaderas más importantes con un total de 118 millones de toneladas (t) de carne en el año 2019, siguiendo en alza año tras año, debido al aumento de su consumo (FAOSTAT, 2021a). Europa representa un 16,51 % de la producción detrás de América y Asia que representan el 77 %. Como principal productor se sitúa Estados Unidos (EEUU), aunque Brasil lidera el mercado mundial, debido a que destina la mayor parte de la producción a la exportación (FAOSTAT, 2021a; MAPAMA, 2021). A nivel europeo, El Reino Unido encabeza la producción de carne avícola con 1,72 millones de t, siendo España el segundo país productor en Europa con 1,41 millones de t. En la península se concentra la mayoría de la producción en Galicia (13,1 %), Andalucía (15,8 %), la Comunidad Valenciana (16,9 %) y Cataluña (28,7 %; FAOSTAT, 2021b; MAPAMA, 2021).

La alimentación en las aves supone el 70 % del coste total de la producción, y además se trata de un área que interactúa directamente con los principales retos a los que se enfrenta la producción avícola del presente y del futuro (maximizar la eficiencia y rentabilidad, garantizar el bienestar, producción de calidad, seguridad alimentaria y respetar el medio ambiente). Las exigencias actuales están llevando a la ganadería a una intensificación con responsabilidad ambiental e innovación de la sostenibilidad dado que todo alimento que no sea aprovechado por el animal se elimina, produciendo pérdidas económicas y medioambientales (SELECCIONES AVÍCOLAS, 2017). Una prueba de ello, es que las aves de corral para su mantenimiento (digestión, metabolismo y equilibrio corporal) y crecimiento (deposición de proteína en el músculo), usan el 35 % del nitrógeno (N) ingerido, el 15 y 50 % restante, lo excretan en las heces y orina, respectivamente (Ferket et al., 2002).

La eficiencia alimentaria es clave para maximizar la eficiencia del sistema, así como los resultados productivos. Los rendimientos productivos dependen en gran medida de los ingredientes de la ración, del valor nutritivo y de su correspondiente digestibilidad (Ravindran, 2013). Una alimentación de alta calidad con conocimiento exacto de la formulación de la dieta, que se encargue de las funciones productivas y de mantenimiento, asegura la producción (Kidd y Tillman, 2016). En este contexto, el desarrollo de una nutrición de precisión es fundamental para el animal, a través del uso eficaz de los recursos alimenticios para maximizar su respuesta, mediante una dieta diaria beneficiosa y específica para la fase en la que se encuentre el pollo de engorde (Paulino, 2017; Sleman et al., 2015).

La proteína es uno de los componentes principales de una dieta. Por ejemplo, en la fase de iniciación de pollos de engorde, la proteína representa un 20 % de la dieta. Por lo tanto, uno de los ingredientes más costosos de ésta (ALLTECH, 2019; Santomá y Mateos, 2018). Los pollos de engorde se benefician de las proteínas y los aminoácidos que la conforman. Un déficit de uno o más aminoácidos en el pollito, provocará una depresión en el crecimiento dando lugar a una mala conversión del alimento (Sleman et al., 2015; Khan, 2015), y la pérdida del resto de aminoácidos. Por otra parte, la proteína no digerida puede contribuir a la aparición de problemas de salud digestiva, sobre todo si es potencialmente fermentable en el tracto digestivo, aumentando las posibilidades de formación de compuestos perjudiciales como es el amoníaco, el escatol, los indoles o poliaminas (Apajalahti y Vienola, 2016), y al desarrollo de microorganismos patógenos.

Es por ello por lo que se emplea el concepto de proteína ideal, ya nombrado en 1997 por Emmert y Baker, definido como el balance adecuado de aminoácidos en el alimento, cuyo objetivo es satisfacer las necesidades de mantenimiento y proteína del animal, reduciendo al

mismo tiempo la excreción de nitrógeno al medio ambiente y el uso de proteína como fuente de energía. La proteína ideal puede usarse en la formulación, pero no siempre se contempla paralelamente la cantidad de funciones en la que participan los aminoácidos, ya sea en relación con otros nutrientes de la ración o en la propia fisiología del animal. Según el estado higiénico-sanitario y fisiológico entre otras variantes del animal, varía la fracción de proteína ideal (Santomá y Mateos, 2018). Frente a un problema, existe un balance entre la fase crítica y los aminoácidos que actúan en esta situación. Al necesitarse en mayor cantidad por ese problema adverso se debe degradar una cantidad considerable de proteína muscular para cubrir las necesidades de aminoácidos de la fase en la que se encuentra el animal, ya sea por falta de alimento o agua, cambios extremos de temperatura, entre otros (Belloir et al., 2015). La formulación de las materias primas en relación con los aminoácidos que contiene, ligado al conocimiento de la digestibilidad de éstos, son eslabones importantes para la fabricación de dietas más precisas que consigan que se avance en el metabolismo y la nutrición de los pollos de engorde (Baker, 2009; Kidd y Tillman, 2016).

Los últimos estudios muestran que los aminoácidos actúan en varias vías metabólicas como reguladores. Estos participan en las acciones de los tejidos espláncnicos, siendo estos tejidos los primeros que se exponen a la absorción de un nuevo nutriente y se encargan de su distribución. También participan con los músculos esqueléticos, estimulando la síntesis proteica e inhibiendo la proteólisis, para la inducción de la ganancia de proteína. Los niveles de aminoácidos influyen en la grasa abdominal y el rendimiento de la pechuga. La disminución del almacenamiento de glucógeno se encuentra relacionada con la hipertrofia del músculo. Un equilibrio o desequilibrio de estos nutrientes puede ejercer acción sobre el almacenamiento de éste y también sobre el pH final de la pechuga (Belloir et al., 2015). Al realizar el suministro adecuado de aminoácidos en la ración no se limita la síntesis de proteínas y, por tanto, se mejoran los rendimientos de índices de conversión (IC) y se reduce el coste en la alimentación (Zeitz, 2018).

El suministro insuficiente de los aminoácidos provoca una reducción de la síntesis de proteína. Para un uso correcto de los mismos, es necesario el conocimiento de las diferentes funciones que realiza en el animal (Campos et al., 2008). Por ejemplo, la metionina es necesaria para todas las reacciones de metilación como la de las histonas implicadas en la regulación epigenética o metilación del ADN, ya que se trata de una fuente de grupos metilo (Belloir et al., 2015). Además, participa en la síntesis de proteínas, y se encuentra en músculos, órganos y plumas en conjunto con la cisteína. Una deficiencia de metionina aumenta las proporciones de grasa abdominal y reduce el funcionamiento inmunitario y el rendimiento del crecimiento (Elahi et al., 2020). La lisina es esencial en el pollo de engorde, su déficit es responsable de una reducción del músculo de la pechuga. También se demostró que un aumento de su proporción en la ración aumenta el pH final en el almacenamiento y reduce la pérdida por goteo del músculo de la pechuga. Este aminoácido suele utilizarse de forma frecuente de referencia y el resto de los aminoácidos son representados a partir del mismo. Se sabe también que las necesidades de lisina dependen del sexo, siendo éstas un 10 % más para el macho (Baker, 2009). La mucina, que se encarga de proteger la mucosa digestiva, es una capa muy rica en treonina, (Chen et al., 2017). La glicina es el cuarto aminoácido limitante, tras la metionina, lisina y treonina. Ésta es importante para la síntesis de ácido úrico, para la excreción de residuos nitrogenados, formación de hematíes y en conjunto con la serina se encuentran en casi todas las proteínas del cuerpo como el colágeno, la elastina o la queratina (Elahi et al., 2020). La glutatona y la taurina, que son necesarias en la defensa frente a un estrés oxidativo, requieren de la cisteína para su síntesis (Chen et al., 2017).

En relación con todas las funciones en las que participan los aminoácidos, el concepto de digestibilidad de este nutriente en el pollo de engorde va a ser determinante. La formulación de los piensos sería más correcta si se basará en contemplar los aminoácidos digestibles o útiles para el mantenimiento y la producción, en lugar de los aminoácidos disponibles (Ravindran et al., 2017). A esto se le debe sumar el conocimiento de las características nutricionales de las materias primas, haciendo especial atención a los aportes de aminoácidos esenciales digeribles (lisina, metionina, cisteína, treonina, valina, isoleucina, leucina, triptófano, arginina, fenilalanina, tirosina e histidina; Belloir et al., 2015). Sin embargo, el conocimiento de la digestibilidad de los aminoácidos se realiza mediante un análisis de la digestibilidad ileal (aparente o estandarizada), y este protocolo no está actualmente estandarizado, dando lugar variaciones en los resultados de diferentes investigaciones por diferencias en la estirpe, el sexo, el carácter de selección de la línea, entre otros (Ravindran et al., 2017).

Con las pérdidas de nitrógeno se puede tener conocimiento de los requerimientos de aminoácidos para la etapa de mantenimiento (descritos como la cantidad necesaria de aminoácidos para el equilibrio del peso corporal) ya que, estas pérdidas se van produciendo siempre que el animal se esté alimentando (Mc Donald, 2011). Es posible conseguir de manera general las necesidades para cada aminoácido digerible, calculándolo a partir de las retenciones netas de aminoácidos, la utilización de los aminoácidos absorbidos y las necesidades en mantenimiento (Lemme et al., 2003). Con todo esto aumentaría la eficacia de la utilización de los aminoácidos en las raciones de pienso (Sakomura et al., 2015). Así, muchos autores (Edwards et al., 1997; Lemme et al., 2004; Liu y Selle, 2017), utilizando el concepto de proteína ideal, han estudiado el ajuste de cada uno de los aminoácidos suministrados y cómo son absorbidos a nivel ileal para maximizar el crecimiento y reducir la excreción de nitrógeno al medio ambiente.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVO

A lo largo de la introducción se ha visto la importancia y los esfuerzos que se han hecho en definir el concepto de proteína ideal para maximizar el crecimiento de los pollos y reducir la excreción de N al medio ambiente. La mayoría de estos esfuerzos se ha dirigido a ir definiendo las necesidades de cada aminoácido, uno a uno, a nivel de aminoácido digestible ileal (aparente o estandarizado). Sin embargo, esta determinación es incompleta y debido a las interacciones entre el metabolismo y utilización de los diferentes aminoácidos hacen complicada esta labor.

Es por ello, que sería importante disponer de las necesidades netas de cada uno de estos aminoácidos a la hora de formular dichas dietas ideales. Se han realizado ya algunos avances en la definición de las necesidades de crecimiento, a partir de las retenciones de estos en los animales. Sin embargo, la información sobre las necesidades de mantenimiento para cada uno de los aminoácidos en pollos es limitada, debido a la dificultad en su determinación.

El objetivo principal de este trabajo es conocer la evolución de las pérdidas de aminoácidos en el cuerpo de pollitos de engorde de primera fase (0-14 días) alimentados con una dieta libre de nitrógeno (N-free).

Esta información es necesaria para determinar el momento adecuado de eutanasia de los animales, que nos permita determinar las necesidades netas de aminoácidos para mantenimiento. Definir con exactitud estas necesidades contribuirá a ampliar la información necesaria y diseñar dietas mucho más eficaces para pollos de engorde, a la vez que se minimizaría la excreción de nitrógeno al medio ambiente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El experimento fue llevado a cabo en la sala 4 de la unidad de cebo aviar del Centro de Investigación y Tecnología Animal (CITA) del Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), situado en el Polígono Industrial La Esperanza, 100, 12400 Segorbe, Castellón (España).

3.2. ANIMALES

Se utilizaron 20 pollos macho de la estirpe Ross 308 de 1 día de vida. Caracterizado por ser un pollo de rápido crecimiento, índice de conversión (IC) eficiente y buen rendimiento de la canal (AVIAGEN, 2017).

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

A su llegada, las aves se dividieron en 4 corrales (5 animales/corral), provistos de bebederos de tetina con recogida de pérdidas, tolvas circulares para el suministro del alimento con una relación de iluminación de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

La prueba tuvo una duración de 17 días. Primeramente, se les suministró a los animales una dieta comercial durante los 10 primeros días. La dieta comercial usada fue acorde a la etapa de los pollitos (Pienso Camperbroiler Iniciación, Nanta), según las recomendaciones descritas por Santomá y Mateos (2018) en las normas FEDNA. A partir del día 10, se administró una dieta libre de nitrógeno (N-free), hasta el día 17.

Con el objetivo de determinar, cómo afectaba la incorporación de la dieta N-free sobre la movilización de los aminoácidos corporales, y definir el protocolo para la determinación de sus necesidades de mantenimiento, se realizó un sacrificio comparativo por tandas a los 0 (10 días) utilizado como referencia, 2 (12 días), 4 (14 días) y 7 (17 días) días después de la administración de la dieta N-free. Cada día de sacrificio se muestrearon 5 animales.

Los animales se pesaron a su llegada y antes del sacrificio en los diferentes días en el que se valoró el efecto de la dieta N-free.

El suministro de la dieta N-free se realizó *ad libitum*. Previo al sacrificio, se realizó un ayuno de 16 horas para la limpieza del tracto digestivo y un pesaje de control minutos antes. El sacrificio de cada pollo se realizó con una sobredosis de Tiopental sódico intracardiaco (75 mg/kg de peso vivo), provocando la muerte instantánea del animal. Después de la muerte, los animales se congelaron a -20 °C hasta su procesado (Tabla 1).

Los animales congelados se cortaron en secciones con una sierra vertical, se trituraron con un cutter, y tras su homogenización, se guardaron muestras en placas Petri. Estas placas se liofilizaron previamente a la molienda fina y seca de la muestra, lista para su uso en los análisis de laboratorio.

Tabla 1. Calendario de la prueba experimental

Fecha	Día	Tareas
21/06/19	1	<ul style="list-style-type: none"> • Recepción, peso de los pollitos en grupo, ubicación en el corral, suministro de dieta comercial y control consumo de pienso.
30/06/19	9	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuno 16 h
01/07/19	10	<ul style="list-style-type: none"> • Cambio a la dieta N-free <i>ad libitum</i> • Pesaje individual • Identificación ala • Sacrificio del grupo día 0
02/07/19	11	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuno 16 h
03/07/19	12	<ul style="list-style-type: none"> • Suministro de N-free <i>ad libitum</i> • Control del consumo de pienso • Identificación del ala • Pesaje y sacrificio en el día 2
04/07/19	13	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuno 16 h
05/07/19	14	<ul style="list-style-type: none"> • Suministro de N-free <i>ad libitum</i> • Control del consumo de pienso • Identificación del ala • Pesaje y sacrificio en el día 4
07/07/19	16	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuno 16 h
08/07/19	17	<ul style="list-style-type: none"> • Pesaje y sacrificio en el día 7

3.4. DIETA N-FREE

La dieta N-free se diseñó en relación con la descrita por Adedokun et al. (2011), fabricando la cantidad necesaria para 20 animales durante 7 días de consumo. Los ingredientes y la composición de nutrientes de la dieta se muestran en la Tabla 2. La dieta se diseñó para cubrir las necesidades de energía y del resto de nutrientes para pollitos de esa edad, excepto las de proteína. La dieta se fabricó en la Planta Piloto de Fabricación de Pienso de la UPV en harina.

La composición química teórica en fresco de esta dieta fue: 20 % de almidón, 64 % de azúcares, 5 % de fibra total dietaria, 5,5 % de extracto etéreo y un 5,5 % de cenizas. Estos componentes analíticos no se analizaron ya que, al tratarse de una dieta sintética a partir de nutrientes puros (Tabla 2), tiene estos componentes con ausencia absoluta de proteína y nitrógeno.

Tabla 2. Composición de la dieta experimental libre de nitrógeno¹.

Ingredientes	%
Almidón purificado	20,05
Dextrosa	64
Arbocel	5,0
Aceite de soja	5,5
Fosfato monocálcico	1,9
Carbonato cálcico	1,3
Bicarbonato de sodio	0,75
Cloruro de sodio	0,29
Carbonato de potasio	0,26
Óxido de magnesio	0,20
Cloruro de colina	0,25
Corrector vitamínico-mineral ¹	0,50

¹Premix vita-oligo sin fitasa (Super V-520 Trouw Nutrition) por kg de premix: Calcio: g/kg 162,47; E5 Manganese (óxido manganeso): mg/kg 16000,00; E6 Zinc (óxido de zinc): mg/kg 10360,00; E4 Cobre (sulfato cúprico pentahidratado): mg/kg 1250,00; E2 Yodo (yoduro de potasio): mg/kg 300,00; E8 Selenio (selenito de sodio): mg/kg 25,00; E1 Hierro (carbonato ferroso): mg/kg 4000,00; E672 Vitamina A: UI/kg 1200000,00; E671 Vitamina D3 : UI/kg 240000,00; 3a700 Vitamina E/acetato de todo-rac-alfa-tocoferilo: UI/kg 1200,00; Vitamina K: mg/kg 320,00; Vitamina B2: mg/kg 880,00; 3a831 Vitamina B6/clorhidrato de piridoxina: mg/kg 300,00; Vitamina B12: mcg/kg 2000,00; 3a315 Niacinamida: mg/kg 4000,00; Pantotenato cálcico: mg/kg 1345,00; Acido pantoténico: mg/kg 1237,40; 3a316 Ácido Fólico: mg/kg 80,00; 3a890 Cloruro de colina: mg/kg 47500,00; Betaina: mg/kg 10830,00; E562 Sepiolita: g/kg 319,15; E320 Butilhidroxianisol (BHA): mg/kg 100,00; E321 Butilhidroxitolueno (BHT): mg/kg 1100,00; E324 Etoxiquina: mg/kg 160,00; Materia seca: g/kg 960,55.

Como suplemento para los pollos, se les suministró disuelto en el agua vitamina AD3E líquida, a una relación de 1 mL por cada 15 L, manteniéndolo durante los 17 días del experimento. El pH del agua se mantuvo entre 6,5 – 7, y por tanto se utilizó ácido clorhídrico para ajustar este parámetro.

3.5. ANÁLISIS QUÍMICOS

Se realizaron los siguientes análisis con las muestras de carne liofilizada y homogeneizada de cada animal.

3.5.1. Determinación de materia seca (MS)

En este análisis se tomó 2 g de muestra, siguiendo el método 934.01 de la Association of Official Chemists (AOAC, 2000).

3.5.2. Determinación de proteína bruta (PB)

Se tomó en este análisis 0,5 g de muestra por cada animal, utilizando el método 976.05 de la Association of Official Chemists (AOAC, 2000).

3.5.3. Determinación de aminoácidos totales y azufrados

Se utilizó para este análisis el método “Aminoacids of food análisis by HPLC “descrito por Kivi (2000).

Se comenzó preparando las muestras para su evaluación con una hidrólisis ácida con HCl 6N durante 23 h a una temperatura de 110 °C siguiendo el protocolo que realizó Bosch et al.

(2006). Los aminoácidos son derivatizados con AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato) y separados con una columna C-18 de fase inversa (modelo AcQ Tag de Waters, 150 mm x 3.9 mm). Se empleó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Waters, USA) para realizar la separación de los distintos aminoácidos y se usa como patrón interno tras la hidrólisis el ácido alfa-amino-butírico, para la cuantificación de los aminoácidos tras dicha separación. La identificación se realizó por comparación de los tiempos de retención con los de un patrón H de aminoácidos de Pierce (Thermo Fisher Scientific Inc. IL, USA).

La metionina y la cisteína se clasifican como aminoácidos azufrados y deben determinarse por separado del resto como metionina sulfona y ácido cistéico respectivamente. Para ello se realizó una oxidación con ácido perbórmico y posterior hidrólisis con HCl 6N.

Para ambos análisis de aminoácidos se pesa la cantidad de muestra correspondiente a 25 mg de PB, lo que supone un total de 45 mg por muestra. Los resultados del análisis fueron corregidos con los valores de materia seca determinados en un inicio.

3.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de peso vivo de los pollitos a lo largo del experimento fueron analizados según un modelo de medidas repetidas a través de un procedimiento mixed en SAS (SAS versión 9.1., SAS institut Inc., Cary, North Carolina, USA). El modelo incluyó como efecto fijo el día de introducción de la dieta N-free (0, 2, 4 y 7) y como efecto aleatorio el individuo, considerando la falta de homocedasticidad de los datos. Se realizó un test de comparación de medias mediante el ajuste de Bonferroni.

Los requerimientos de proteína y aminoácidos se calcularon como la diferencia entre el contenido en proteína del cuerpo vacío de un determinado día (2, 4 ó 7), respecto al contenido de este nutriente del día de referencia (0, 2 ó 4) por el número de días. De esta forma se obtuvo los requerimientos diarios para los días 2, 4 y 7 respecto al día 0, para los días 4 y 7, respecto al día 2 y para el día 7, respecto al día 4. Para analizar estos datos de requerimientos diarios de proteína y aminoácidos se utilizó un modelo GML de SAS, incluyendo el momento de cálculo (0-2, 0-4, 0-7, 2-4, 2-7 y 4-7) como el único efecto fijo. También se hizo un test de comparación de medias utilizando el test de Bonferroni.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. COMPORTAMIENTO DE LOS POLLOS DE ENGORDE DURANTE EL SUMINISTRO DE LA DIETA N-FREE

El comportamiento de los pollos de engorde a lo largo de la prueba se puede observar en la Figura 1, representando tanto el consumo de alimento medio como los pesos vivos de los animales los días 0, 2, 4 y 7 después de la administración de la dieta N-free. En la Figura 1 se observa como los animales aumentaron la ingesta de la dieta N-free gradualmente de 3 a 16 g/d. Se conoce que los pollos de raza Ross 308 con esta edad tienen una ingestión de 59, 71 y 89 g/d, respectivamente (AVIAGEN, 2017).

Por lo tanto, los consumos con la dieta N-free fueron bajos y la introducción de esta dieta precisó de un periodo de adaptación intentando alcanzar unos consumos estables. Esta situación es habitual cuando se utilizan dietas sintéticas, y el objetivo principal es que dicha ingestión permita al menos un funcionamiento mínimo del tracto digestivo (a diferencia de métodos basados en el ayuno), para tener en cuenta en la determinación de las necesidades de mantenimiento las pérdidas endógenas por digestión. Sería recomendable testar otras fórmulas en un futuro que mejoren esta situación, por ejemplo, utilizando otra fuente de fibra, aumentando la proporción de almidón y, a pesar de su dificultad, tratando de granular dicho pienso (al menos hasta obtener migajas).

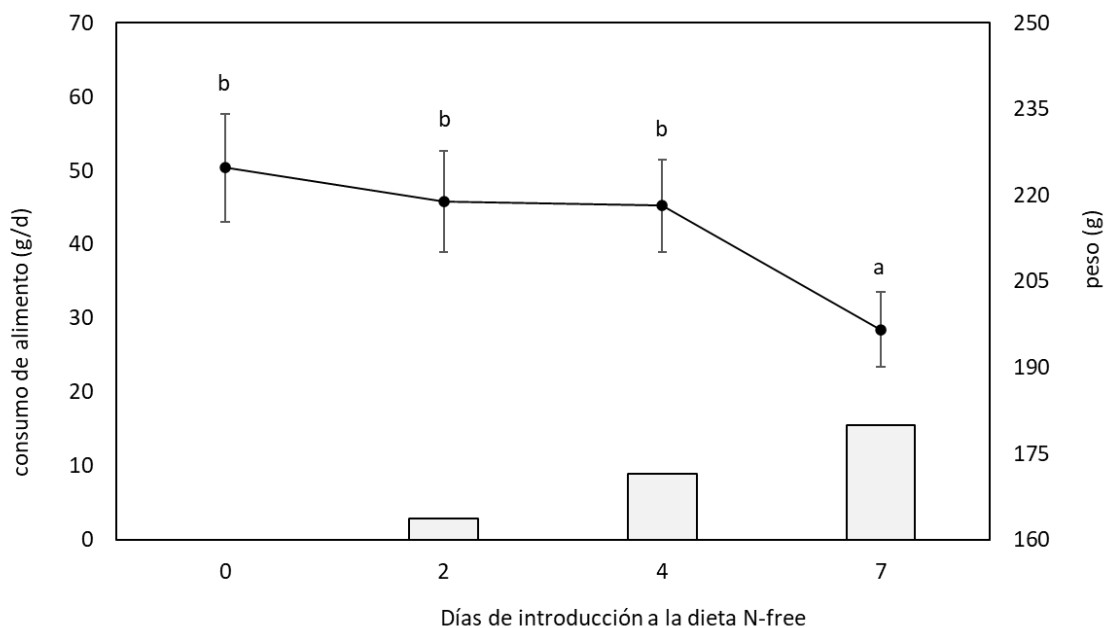


Figura 1. Efecto de la dieta N-free durante los días 0, 2, 4 y 7 en ingesta de alimento (g/día) y peso corporal (g), en pollos de engorde de 10 días de vida. (Las columnas muestran la ingesta de alimento por día y los puntos muestran la media de peso del cuerpo entero en los días de pesaje/sacrificio. Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$; Peso, $n=5$))

Además, la Figura 1 muestra la evolución del peso medio de los pollos a lo largo de los 7 días de la prueba, viendo que existieron diferencias significativas entre el día 7 (196,56 g) con el resto. Resultó que conforme iban pasando los días, la ingesta de pienso era superior, pero el peso del pollo disminuía. Como hipótesis, esto podría estar indicando la existencia de un periodo de adaptación en el intervalo de días entre 0 y 2 de la introducción de la dieta N-free, donde los pollitos aún tendrían acceso a restos del pienso previo en suelo, y que el efecto sobre la bajada de peso se observe a partir de dicho momento, pudiendo coincidir con una movilización de proteína en los días 5, 6 y 7. Con esto se podría definir el intervalo de 2 a 4-5 días tras el suministro de la dieta N-free, el momento para la medición de los requerimientos de mantenimiento de los pollos, ya que en principio estos aminoácidos no estarían directamente relacionados con el peso corporal, sino con funciones más básicas. Lo ideal sería determinar las necesidades de mantenimiento en un periodo donde no se esté produciendo grandes movilizaciones de proteína corporal como fuente de aminoácidos, e incluso de energía (debido al escaso consumo). Una modificación de la energía y proteína de la dieta puede afectar a la composición corporal, modificando su contenido en los tejidos (Wecke et al., 2018), y probablemente ocurriría lo mismo con los aminoácidos.

3.2. PÉRDIDAS DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS EN EL CUERPO ENTERO

Una vez analizada la ingesta del alimento y la evolución del peso vivo pollo con la dieta N-free, se calcularon las pérdidas de proteína y aminoácidos en el cuerpo entero de los pollos, equivalente a los requerimientos diarios de proteína y aminoácidos en tres periodos distintos: desde el día 0 al 7 (periodo 1), desde el día 2 al 7 (periodo 2) y desde el día 4 al 7 (periodo 3). Cada periodo tuvo uno o varios intervalos de días y un día de referencia distinto. Se definió para el periodo 1, los intervalos del día 0 a 2, 0 a 4 y 0 a 7 (tomando como referencia el día 0), para el periodo 2 los intervalos del día 2 a 4 y 2 a 7 (tomando como referencia el día 2) y por último el periodo 3 comprendió el intervalo del día 4 a 7 (tomando como referencia el día 4).

En este estudio se consideró la siguiente hipótesis para decidir el periodo de elección para la determinación de las necesidades netas de mantenimiento de proteína y de los aminoácidos. Cuando se suministra una dieta N-free, los aminoácidos del cuerpo son utilizados durante los primeros días para mantener dichas necesidades de mantenimiento inalteradas. Sin embargo, si esta situación se mantiene en el tiempo, el animal podría desarrollar cambios adaptativos reduciendo ciertas actividades vitales ante esta situación. Por ello, se consideró como potenciales candidatos aquellos periodos en los que se maximice la movilización de proteína y aminoácidos en el corto periodo de tiempo de esta prueba.

Los resultados obtenidos para las necesidades netas diarias de proteína (calculada como la diferencia del contenido en proteína dividida por los días del intervalo) fueron variables en función del intervalo y día de referencia utilizado (Figura 2). Cuando tomamos como referencia el día 0 (periodo 1), del día 0 al 2 se observó el pico de mayores necesidades netas de proteína del periodo 1 (0,85 g/día) comparado con los otros dos intervalos (0-4 y 0-7). Sin embargo, cuando tomamos de referencia el día 2 o el día 4 (periodos 2 y 3), las necesidades netas de proteína fueron similares, con el valor más alto de 1,37 g/día para el intervalo (2-4), sin encontrar diferencias significativas entre el resto de días. Estos resultados nos indican que una vez superado el periodo de adaptación a la dieta N-free, los resultados de pérdidas de proteína son más homogéneos, pudiendo ser candidatos para el control de las necesidades de

mantenimiento de proteína, la variación de la proteína retenida durante un periodo de 2-3 días tras dos días de adaptación a la dieta N-free.

La lisina como se ha comentado anteriormente es el aminoácido de referencia en la mayoría de las raciones, por eso se trató de forma individualizada, así como, con la relación de la misma con los otros aminoácidos. Ya se observó que una buena biodisponibilidad de lisina en dietas para pollos de engorde de 1 a 21 días de edad, está directamente relacionado con la ganancia de peso (Cortes, et al., 2011). Se observó (Figura 3) el pico de máximas necesidades en el intervalo del día 2 a 4 con 139 mg de lisina/día. Por el valor alcanzado (139 mg/d) y en comparación con los valores del resto de aminoácidos que se obtienen más adelante, la lisina parece ser un aminoácido importante para el mantenimiento en estas fases iniciales del crecimiento del pollito. Por otra parte, de nuevo se observa que las pérdidas de lisina cuando se toma como referencia el día 0 fueron significativamente más bajas ($P < 0.05$). Estos resultados reforzarían la idea de que el control de las necesidades netas de mantenimiento debería hacerse tras dos días de adaptación a la dieta N-free, y probablemente en el período que se produce durante los siguientes 2-3 días, antes de que los valores se vuelvan a reducir.

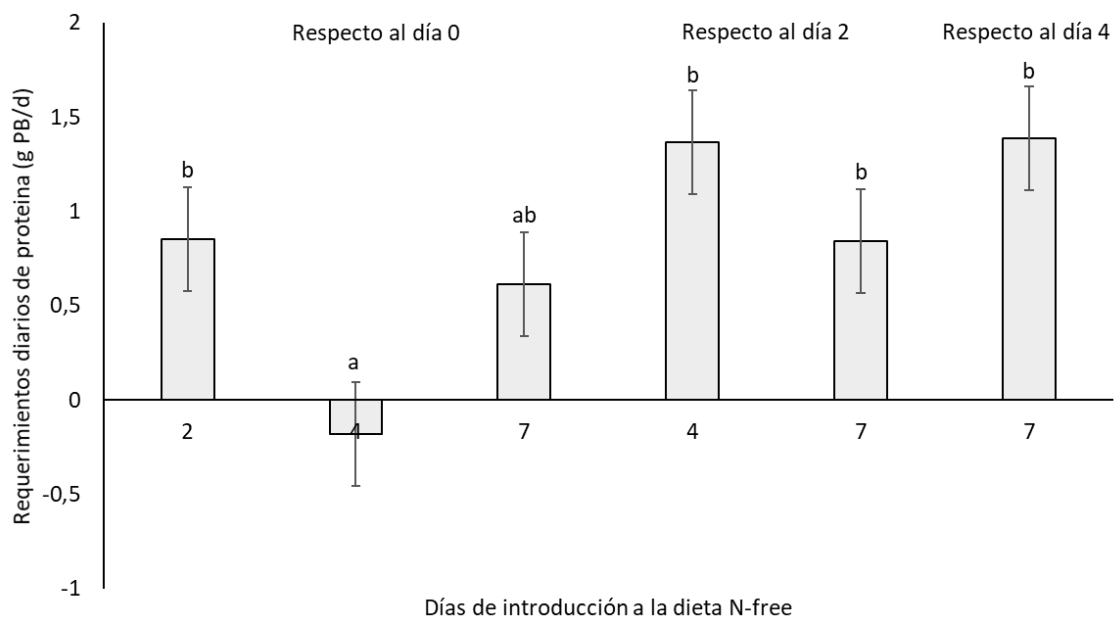


Figura 2. Requerimientos diarios de proteína bruta en g por día, según el día de inicio de la valoración. (Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (PB, n=5)

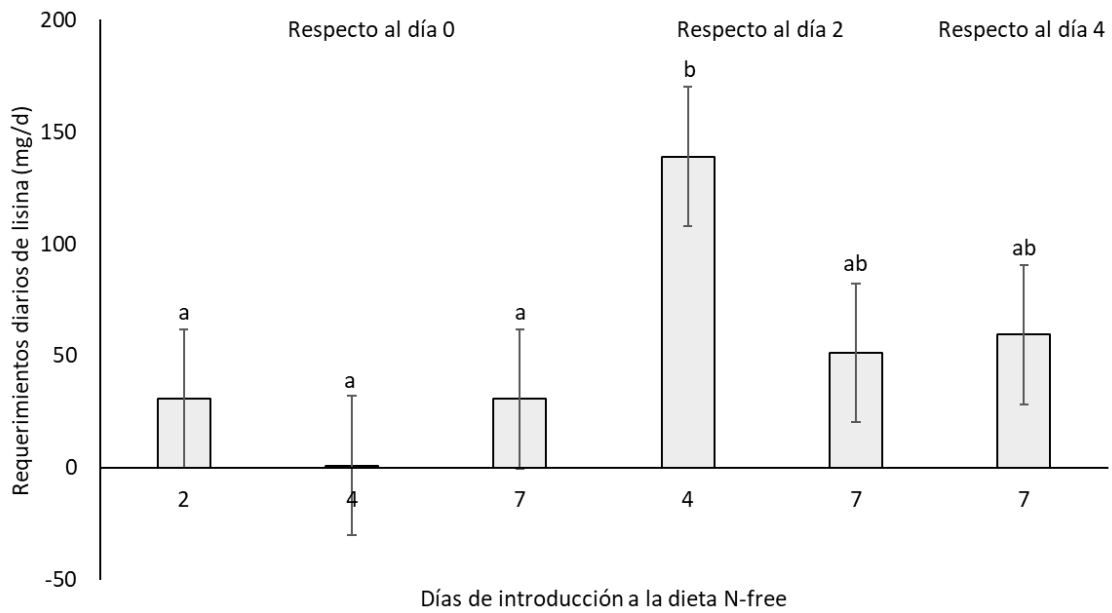


Figura 3. Requerimientos de lisina en mg por día, según el día de la valoración. (Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (Lisina, $n=5$))

Del mismo modo, los valores máximos de movilización de arginina y treonina se observaron para el período 2-4 días después de la introducción de la dieta N-free (Figura 4), suponiendo un 46 y 19% de las necesidades de lisina.

Sin embargo, los aminoácidos azufrados parecen comportarse de forma diferente. Sólo se observó una movilización de estos aminoácidos en el periodo que va de 4 a 7 días después de la introducción de la dieta N-free. De hecho, en el periodo donde hemos observado como adecuado para el resto de los aminoácidos (de 2 a 4 días), el valor de necesidades para estos dos aminoácidos azufrados sería incluso negativo. Estos resultados pueden ser debido a varias razones. La primera de ellas sería la dificultad de movilización de estos aminoácidos, especialmente presentes en las plumas. De hecho, Muramatsu y Okumura (1979) encontraron que, si se alimentaban con una dieta sin proteínas o con una dieta suplementada con metionina más arginina durante 10 días, el contenido de nitrógeno de las plumas en los pollitos aumentó en comparación con los valores iniciales, mientras que en otros tejidos, especialmente en los músculos, el contenido de nitrógeno disminuyó. Muramatsu y Okumura (1980) indican así que, cuando suplementan una dieta N-free con metionina más arginina, parece disminuir la cantidad de estos aminoácidos que se producen endógenamente por descomposición de proteínas de otros tejidos para el crecimiento de las plumas, lo que resulta en una mayor reutilización de aminoácidos y una menor degradación de proteínas corporales. Por otra parte, una segunda opción podría ser la dificultad de la determinación de los propios aminoácidos azufrados. De hecho, se está afinando la técnica en el grupo para mejorar su recuperación.

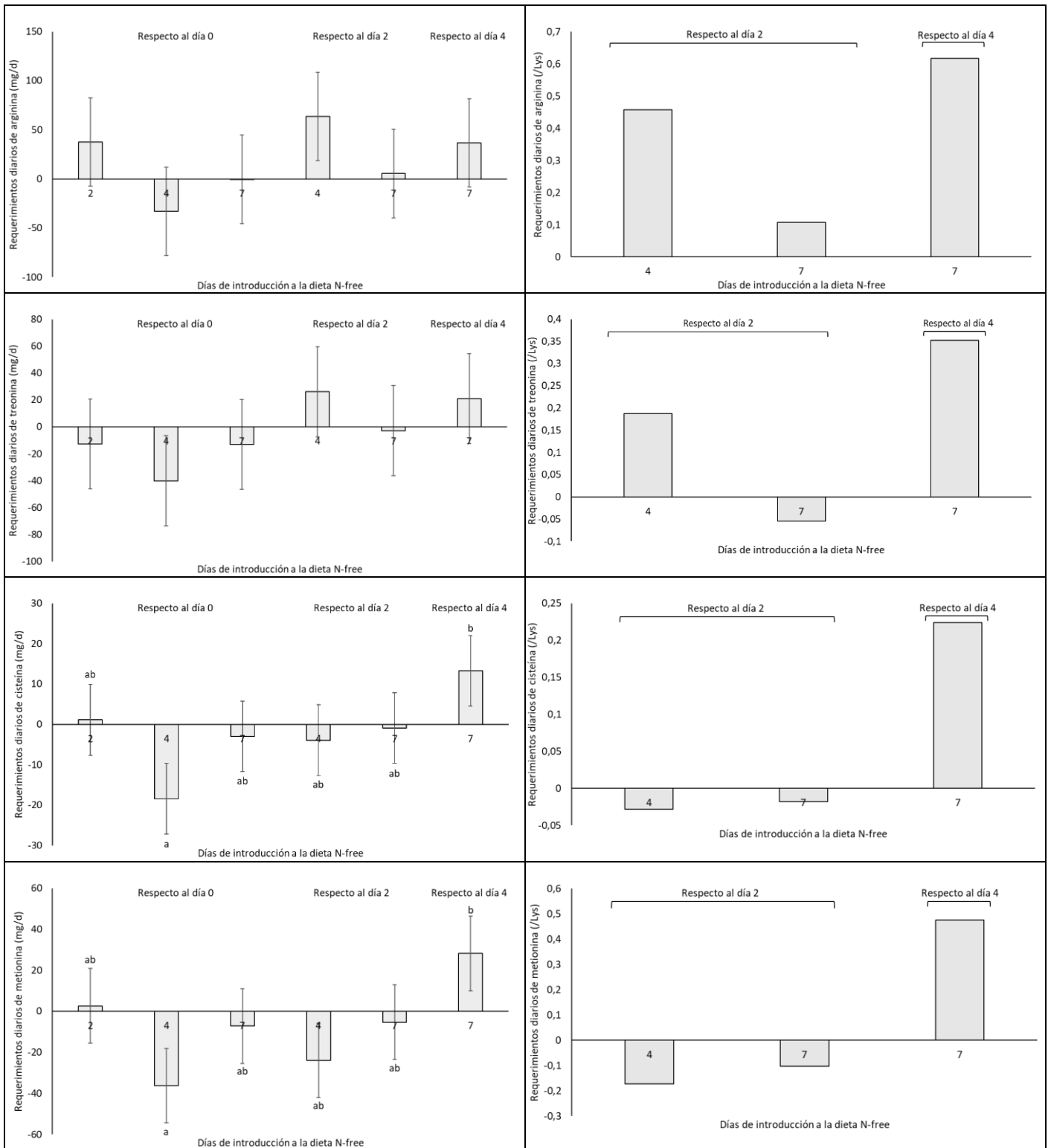


Figura 4. Requerimientos de arginina, treonina, cisteína y metionina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (aminoácido, $n=5$).

La histidina (Anejo I) no reflejó diferencias en ningún momento del estudio, aunque su intervalo de máximas necesidades parecía ser del día 2 al 4. Para la leucina, la isoleucina y la valina se comportaron de forma semejante, siendo nuevamente el periodo de máximas necesidades con existencia de diferencias significativas del día 2 al 4, y en el caso de la isoleucina se le añadió el intervalo de 4 a 7. Para los 4 aminoácidos que se representaron en el Anejo II, existieron diferencias significativas en los intervalos seleccionados, destacando el intervalo de 2 a 4 días con el momento de máximas necesidades. La alanina, la fenilalanina y la serina, no presentaron diferencias significativas en ninguno de los periodos (Anejo III). Sin embargo, nuevamente presentaron más necesidades que la lisina en el intervalo del día 4 al 7 respectivamente a excepción de la serina que se observó del día 2 al 4. La glicina sí que presentó diferencias significativas en los intervalos de días, destacando en el periodo 2 del día 2 al 4. Por todo ello, en lo que se refiere a las necesidades relativas en relación al nivel de lisina, los valores obtenidos para el periodo de 2 a 4 días después de la introducción de la dieta N-free, fueron los más frecuentes.

3.3. NECESIDADES NETAS DE MANTENIMIENTO

A partir de lo observado, podríamos resumir la mayoría de los aminoácidos, con la excepción de los azufrados, su nivel máximo de movilización en el intervalo de 2 a 4 días de introducción de la dieta N-free. Este periodo es un momento donde no se ven comprometidas de manera sustancial los parámetros de consumo y peso. Por ello, se decidió éste periodo como válido para la determinación de las necesidades netas de mantenimiento para los aminoácidos y su comparación con los valores aportados por otros autores bajo el concepto de proteína ideal para las necesidades totales de los animales (Tabla 3), ya que en la actualidad no disponemos información de necesidades netas de ningún aminoácido (Wu, 2013; Wu et al., 2014; Santomá y Mateos, 2018).

En esta comparativa, se observó que hay algunos aminoácidos cuyas necesidades relativas de mantenimiento son similares a las que se recomiendan para las necesidades totales, como son la histidina, valina, fenilalanina, isoleucina, metionina y cisteína (estas dos últimas utilizando los valores del periodo 4-7 días posteriores a la introducción de la dieta N-free). Esto indicaría que estos aminoácidos se utilizan a un nivel similar relativo tanto en crecimiento como en mantenimiento, siendo sus recomendaciones similares independientemente del componente de necesidades considerado. Sin embargo, hay otros aminoácidos cuyas necesidades relativas de mantenimiento obtenidas fueron inferiores a las que se recomiendan para las necesidades totales, como son la arginina, leucina, treonina, alanina, ácido aspártico, ácido glutámico, prolina, glicina y serina. Esto podría estar indicando que sus necesidades serían más elevadas relativamente en la componente de crecimiento. Por el contrario, la tirosina mostró niveles relativos más altos en sus necesidades netas de mantenimiento, por lo que sería más utilizado en dicha componente, aunque los niveles de fenilalanina+tirosina (la fenilalanina se puede convertir en tirosina) fueron similares a los observados en la bibliografía, por lo que podrían explicar estos resultados.

Tabla 3. Comparación de las necesidades netas (relativas a lisina) de mantenimiento obtenidas en este estudio para los principales aminoácidos con las necesidades totales digestibles a nivel ileal por diferentes autores.

<i>Aminoácido</i>	(Edad de los pollos de engorde)			
	Necesidades netas relativas de mantenimiento (estudio actual) (d 12-14)¹	Necesidades totales digestibles ileales Wu <i>et al.</i> 2014 (d 0-21)	Necesidades totales digestibles ileales Wu 2013 (d 0-10)	Necesidades totales digestibles ileales Santomá y Mateos 2018 (d 0-21)
<i>Lisina</i>	100	100	100	100
<i>Arginina</i>	46	105	111	105
<i>Leucina</i>	76	109	113	110
<i>Histidina</i>	34	35	34	
<i>Valina</i>	69	77	68	79
<i>Metionina</i> ¹	46	40	31	40
<i>Cystína</i> ¹	23	32	57	34
<i>Treonina</i>	19	67	59	65
<i>Tirosina</i>	68	45	43	
<i>Fenilalanina</i>	46	60	57	
<i>Alanina</i>	33	102	108	
<i>Ác. aspártico</i>	69	122	129	
<i>Ác. Glutámico</i>	146	306	217	
<i>Prolina</i>	61	184	196	
<i>Glicina</i>	79	176	187	
<i>Serina</i>	37	69	73	
<i>Isoleucina</i>	67	67	58	67
<i>Triptófano</i>	-	16	19	17

¹ Se ha utilizado los valores del periodo 4-7 días posteriores a la introducción de la dieta N-free.

4. CONCLUSIÓN

El conocimiento de las necesidades netas de aminoácidos en los pollos de engorde en cada etapa de su crecimiento contribuye a una notable mejora en costes de alimentación, una reducción considerable de la excreción de nitrógeno al medio ambiente, así como a la obtención de una alimentación de mejor calidad, en dirección a nuevos avances en una nutrición de precisión.

Tras el análisis de los resultados y discusión de estos, se concluye:

- La dieta N-free provoca una disminución de la ingestión en comparación a la realizada por un pollo de esta estirpe de forma habitual.
- Se ha podido ajustar el punto de partida para la determinación de las necesidades netas de mantenimiento para los aminoácidos entre el día 2 y 4 después de estar alimentados con una dieta N-free.
- Para el caso de los aminoácidos azufrados se podría ampliar el periodo de ensayo de la prueba.

Ante estos resultados se ha decidido introducir en el protocolo para la determinación de las necesidades netas para los aminoácidos en pollitos de 0 a 14 días las siguiente modificaciones:

1. Mejora de la dieta N-free: aumentar el nivel de almidón a costa del azúcar y cambiar la fuente de fibra por cascarilla o paja de cereal, y tratar de hacer una fórmula granulable, todo ello dirigido a mejorar la ingestión.
2. Evaluar la movilización de los aminoácidos durante 3 días tras 2 días de adaptación a la dieta N-free, esperando que esto sirva para evaluar todos los aminoácidos de interés.

5. BIBLIOGRAFÍA

- ADEDOKUN, S.A.; ADEOLA, O.; PARSONS, C.M.; LILBURN, M.S.; APPLGATE, T.J., 2011. Factors affecting endogenous amino acid flow in chickens and the need for consistency in methodology. *Poultry Science*. 90, 1737-1748.
- ALLTECH, 2019. Cuáles son los costes de alimentación en avicultura. *Alimentación avicultura*. Visto el 20 de mayo de 2021.
- <https://alltechspain.blogspot.com/2019/10/cuales-son-los-costes-de-alimentacion.html>
- AOAC, 2000. AOAC: Official Methods of Analysis (16th ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. Visto el 12 de junio de 2021.
- APAJALAHTI, J. VIENOLA, K., 2016. Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion. *Animal Feed Science and Technology*, 221, 323-330.
- AVIAGEN, 2017. Pollo de engorde Ross 308 AP: Objetivos de Rendimiento. Visto el 2 de junio de 2021.
- http://es.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Spanish_Tech_Docs/Ross308AP-Broiler-PO-2017-ES.pdf
- BAKER, D.H.; 2009. Advances in protein–amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids* 37, 29-41.
- BELLOIR, P.; LESSIRE, M.; BERRI, C.; LAMBERT, W.; CORRENT, E.; TESSERAUD, S., 2015. REVISITING AMINO ACID NUTRITION. 20th European Symposium on Poultry Nutrition. Prague, Czech Republic. 24–27.
- BOSCH, L.; ALEGRIA, A.; FARRÉ, R., 2006. Application of the 6-aminoquinolyl- N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC) reagent to the determination of amino acids in infant foods. *Journal of Chromatography B*. 831, 176-183.
- CHEN, Y.P.; CHENG, Y.F.; Li, X.H.; YANG, W.L.; WEN, C.; ZHUANG, S.; ZHOU; Y.M., 2017. Effects of threonine supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status, intestinal integrity and barrier function of broilers at the early age. *Poultry Science*. 96, 405-413.
- CORTES, A.; MARTÍNEZ, C.; AVILA, E., 2011. Biodisponibilidad de lisina para el pollo en crecimiento de cuatro harinas de subproductos avícolas. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. México. Volumen 2, 3.
- EDWARDS III, H.; BAKER, D.; FERNANDEZ, S.; PARSONS, C., 1997. Maintenance threonine requirement and efficiency of its use for accretion of whole-body threonine and protein in young chicks. *British Journal of Nutrition*, 78(1), 111-119.
- ELAHI, U.; WANG, J.; Ma, Y.B.; WU, S.G.; QI, G.H.; ZHANG, H.J., 2020. The Response of Broiler Chickens to Dietary Soybean Meal Reduction with Glycine and Cysteine Inclusion at Marginal Sulfur Amino Acids (SAA) Deficiency. 26pp.

- EMMERT, J.L Y BAKER, D.H., 1997. Use of the ideal protein concept for precision formulation of amino acid levels en broiler diets. *J.Appl. Poult. Res.* 6(4):462-470.
- FAOSTAT, 2021a. Datos productivos de la carne de pollo a nivel mundial. Visto el 2 de mayo de 2021.
<http://www.fao.org/faostat/es/>
- FAOSTAT, 2021b. Datos productivos de la carne de pollo a nivel europeo. Visto el 2 de mayo de 2021.
<http://www.fao.org/faostat/es/>
- FERKET, P.R., VAN HEUGTEN, E.; VAN KEMPEN, T.A.; ANGEL, R., 2002. Nutritional strategies to reduce environmental emissions from nonruminants. *Journal of Animal Science*, 80. 15pp.
- KHAN, D.R., 2015. Studies on dietary methionine efficiency and requirement in naked neck and normally feathered growing chickens. Tesis doctoral. Georg-August-University Goettingen, Alemania. 127 pp.
- KIDD, M.T.; TILLMAN, P.B., 2016. Key principles concerning dietary amino acid responses in Broilers. *Animal Feed Science and Technology* 221, 314–322.
- KIVI, J.T., 2000. Amino acids. In: Nollet, L.M.L. (ed.) *Food Analysis by HPLC*. Marcel Dekker, New York, 55-97.
- LEMME, A.; INDUSTRIES, E.; VIEW, A.O., 2003. The " Ideal Protein Concept " in broiler nutrition 1. Methodological aspects-Opportunities and limitations. *Special Issue* 04. 1-10.
- LEMME, A.; RAVINDRAN, V.; BRYDEN, W.L., 2004. Ileal digestibility of amino acids in feed ingredients for broilers. *World's Poultry Science Journal*, 60(4), 423-438.
- LIU, S.Y.; SELLE, P.H., 2017. Starch and protein digestive dynamics in low-protein diets supplemented with crystalline amino acids. *Animal Production Science*, 57(11), 2250.
- MAPAMA, 2021. Sector avícola de carne en España. Visto el 6 de mayo de 2021.
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/avicola-de-carne/>
- MCDONALD, P.; EDWARDS, R.A.; GREENHALGH, J.F.; MORGAN, C.A.; SINCLAIR, L.A.; WILKINSON, R.G., 2011. *Nutrición animal*. 6ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza España.
- MURAMATSU, T.; OKUMURA, J.; 1979. Effect of dietary Methionine and Arginine on Uric Acid excretion of cocks fed a protein -free diet. *Journal of Nutrition*. Volume 109. Issue 6. 1057-1062.
- MURAMATSU, T.; OKUMURA, J.; 1980. The nitrogen sparing effect of methionine in chicks receiving a protein-free diet supplemented with arginine: effects of various methionine substitutes. *Br. Poultry Science*. 21:273-280.
- PAULINO, J.A., 2017. *Nutrición de precisión para pollo de engorde de alto desempeño*. ENGORMIX, AVICULTURA. Visto el 12 de mayo de 2021.

<https://www.engormiz.com/avicultura/articulos/nutricion-precision-pollo-engorde-t40378.htm>

RAVINDRAN, V., 2013. Disponibilidad de piensos y nutrición de aves de corral en países en desarrollo. 5pp.

RAVINDRAN, V.; ADEOLA, O.; RODEHUTSCORD, M.; KLUTH, H.; VAN DER KLIS, J.D.; VAN EERDEN, E., 2017. Determination of ileal digestibility of amino acids in raw materials for broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*. 225, 62-72.

SAKOMURA, N. K.; SILVA, E.P.; DORIGAM, J.C.P.; GOUS, R.M.; ST-PIERRE, N., 2015. Modeling amino acid requirements of poultry. *Poultry Science Association Inc*. 16pp.

SANTOMÁ G.; MATEOS G.G., 2018. Necesidades nutricionales en avicultura, Normas fedna (2ª edición). Editorial Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid. 194 pp. ISBN: 978-84-09-06529-5.

SELECCIONES AVÍCOLAS, 2017. Alimentación de los pollos del futuro. Visto el 10 de mayo de 2021.

<https://seleccionesavicolas.com/avicultura/2017/04/alimentacion-de-los-pollos-del-futuro-1>

SLEMAN, S.M.; ROBERTO, A.; PAUL, A., 2015. Specialized protein products in broiler chicken nutrition: *Animal nutrition xxx* 1-7pp.

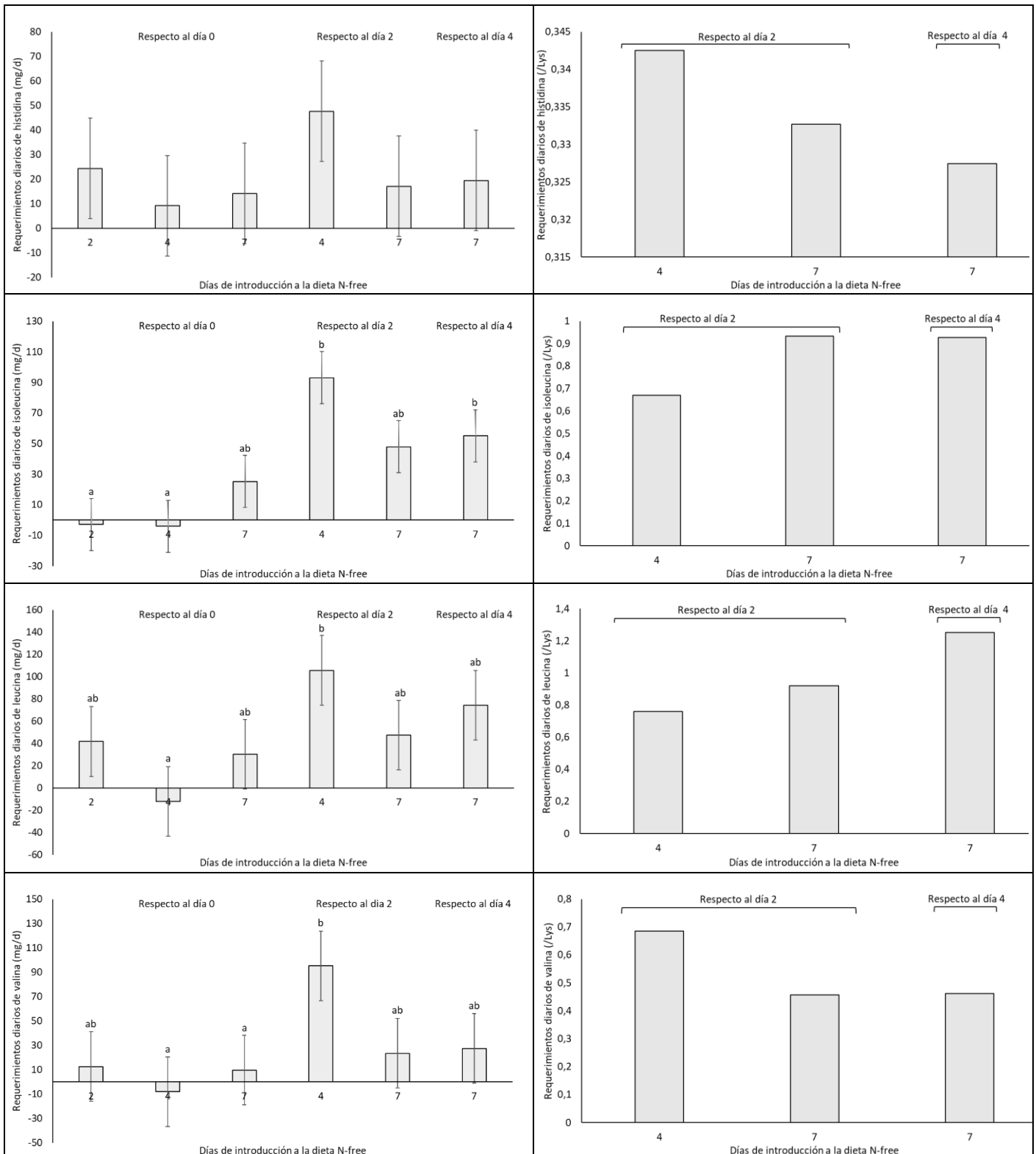
WECKE, C.; KHAN, D.R.; SÜNDER, A.; LIEBERT, F., 2018. Age and Gender Dependent Amino Acid Concentrations in the Feather, Feather-Free and Whole Empty Body Protein of Fast Growing Meat-Type Chickens. *Open Journal of Animal Sciences*, 08(03), 223-238.

WU, G., 2014. Dietary requirements of synthesizable amino acids by animals: a paradigm shift in protein nutrition. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5(1), 34.

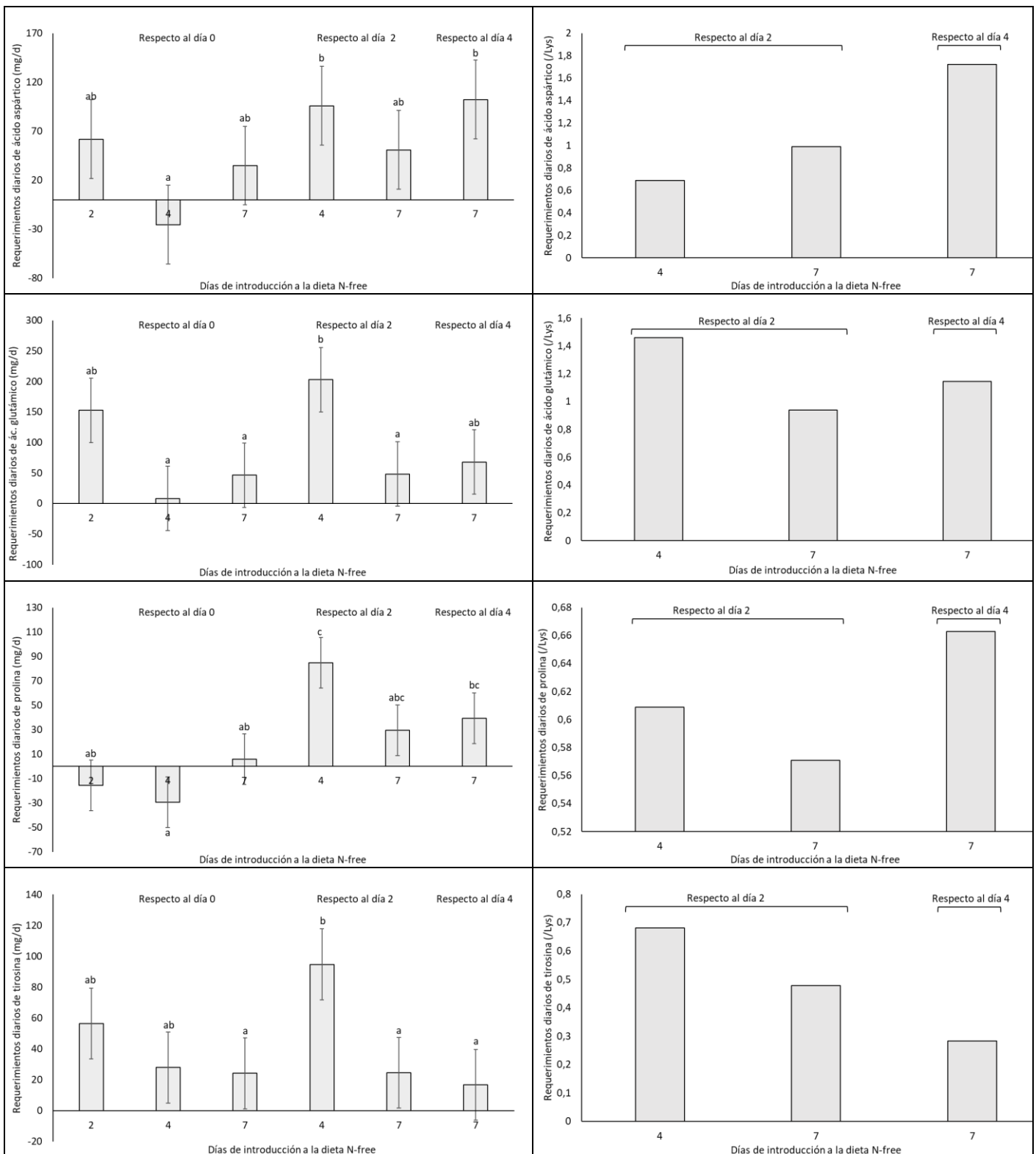
WU, G.; WU, Z.L.; DAI, Z.L.; YANG, Y.; WANG, W.W.; LIU, C.; WANG, B.; WANG, J.J.; YIN, Y.L., 2013. Dietary requirements of “nutritionally non-essential amino acids” by animals and humans. *Amino Acids*. Volumen 44, 1107-1113.

ZEITZ, J.O.; MOHRMANN, S.; KÄDING, S.C.; DEVLIKAMOV, M.; NIEWALDA, I.; WHELAN, R.; HELMBRECHT, A.; EDER, K., 2018. Effects of methionine on muscle protein synthesis and degradation pathways in broilers. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. Volumen 103, Issue 1. 191-203.

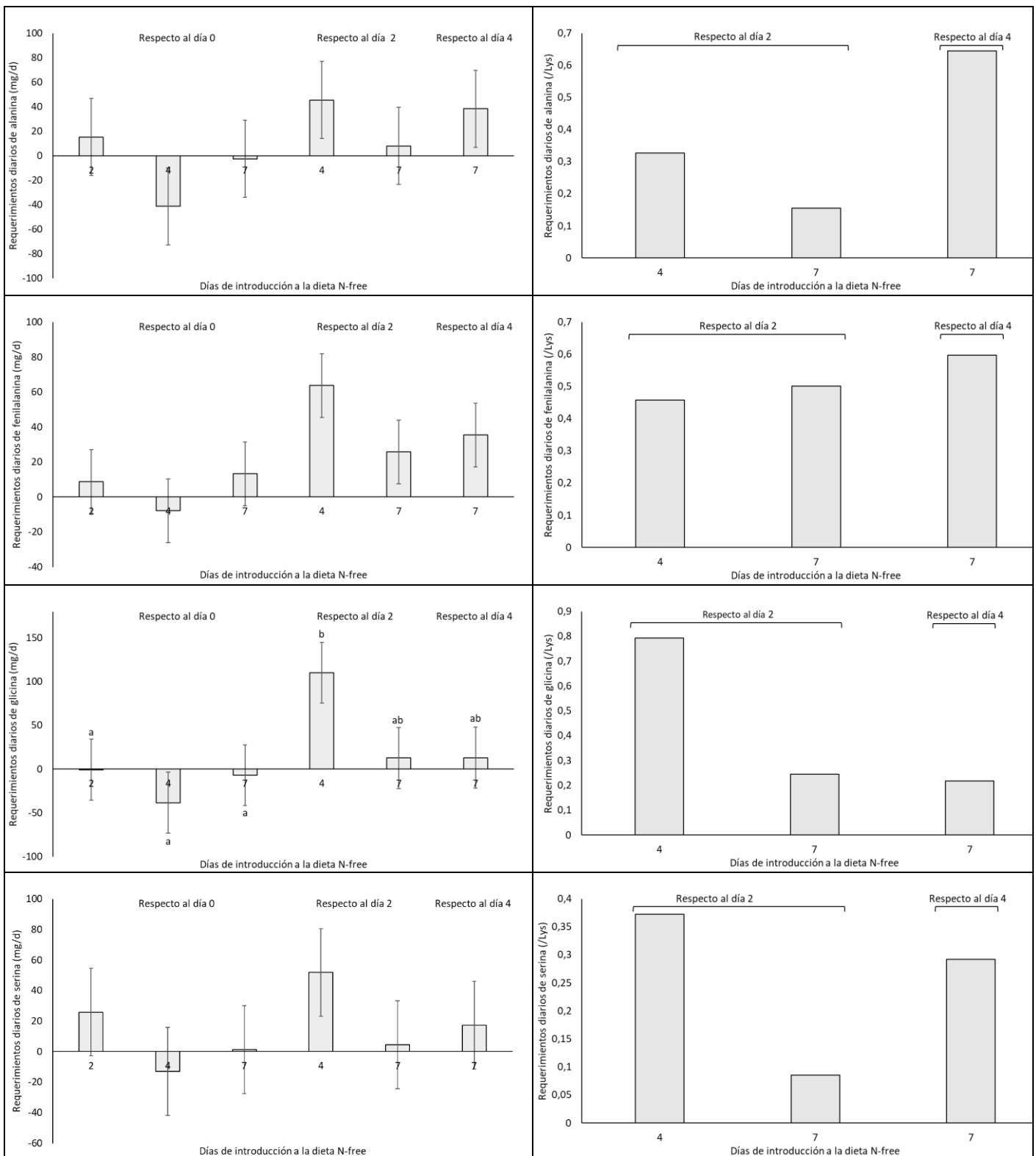
6. ANEJOS



Anejo I. Requerimientos de histidina, isoleucina, leucina y valina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración. (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas (P<0.05). Los datos se representan como medias ± ES (aminoácido, n=5).



Anejo II. Requerimientos de ácido aspártico, ácido glutámico, prolina y tirosina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración. (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas (P<0.05). Los datos se representan como medias ± ES (aminoácido, n=5).



Anejo III. Requerimientos de alanina, fenilalanina, glicina y serina en mg por día y por lisina, según el día de la valoración. (Lys: Lisina; Diferentes letras muestran diferencias significativas ($P < 0.05$). Los datos se representan como medias \pm ES (aminoácido, $n=5$).