

Análisis de alimentos: Aplicaciones prácticas

Ing. Agr. Darío Colomatto, PhD

Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Av. San Martín 4453, C1417DSQ Buenos Aires, Argentina. E-mail: colomatto@agro.uba.ar

Introducción

Los sistemas de producción ganadera de Argentina están basados en el pastoreo directo de los recursos forrajeros, con ocasional uso de suplementos tales como granos, subproductos de cosecha, forrajes conservados como heno o silaje, etc. La suplementación es una práctica muy difundida en los planteos lecheros, donde se busca optimizar la calidad del alimento ofrecido a las vacas para que produzcan la mayor cantidad de leche posible a lo largo de la lactancia. Sin embargo, el forraje base y los suplementos, especialmente los subproductos de cosecha y los forrajes conservados, varían en su calidad a lo largo del año. En el caso de las pasturas y los forrajes conservados, esta variación en la calidad se debe a la especie, la época del año, estado fisiológico, el tipo y cantidad de fertilizante aplicado, el momento de corte o de pastoreo y otros factores. Analizar los alimentos base es entonces importante para caracterizar nutricionalmente los mismos y para seleccionar mejor los suplementos a utilizar, de tal manera que se optimice la producción.

El análisis de alimentos es también importante para garantizar la calidad de productos formulados comercialmente (tal el caso de concentrados energéticos o proteicos). De esta forma el cliente final puede estar seguro de lo que compra. Otra función muy importante del análisis de alimentos es la de detectar la posible presencia de sustancias indeseables que se encuentren presente en los alimentos, las cuales pueden ser dañinas para la salud animal o humana. Un claro ejemplo de esto lo constituyen las aflatoxinas (toxinas producidas por hongos), los residuos de herbicidas o sus coadyuvantes, etc.

Si bien el mejor indicador de la calidad de un alimento dado es la performance animal, su implementación como rutina tiene problemas considerados insalvables: los experimentos utilizando animales son muy costosos y llevan mucho tiempo. Además, el público general se encuentra generalmente en contra de la utilización de animales para experimentación, lo que si bien esta tendencia es más importante en los países desarrollados, no tardará en trasladarse a nuestra región. Como resultado de esto, el análisis de alimentos se lleva a cabo usando técnicas menos invasivas, que intentan predecir alguno de los tres parámetros que constituyen la performance animal: el consumo, la digestibilidad y la eficiencia de utilización (Cherney, 2000). Siendo que las variaciones en el consumo explican entre un 60 y un 90% de la variación en la energía digestible (Mertens, 1994), sería conveniente entonces determinar aquellas características de los forrajes más asociadas al consumo y a la digestibilidad (Cherney, 2000). Entre

ellas, se pueden citar la fibra, la lignina y la proteína cruda, junto con una precisa determinación del contenido de materia seca (Cherney y Mertens, 1998).

Los análisis químicos pueden darnos información sobre los componentes químicos del forraje que influyen en la digestión del mismo. Esto nos permitirá entender mejor los procesos bioquímicos que impactan sobre el desempeño animal. Los análisis químicos no proveen un estimador directo de valor nutritivo, pero mediante asociaciones estadísticas se pueden obtener estimadores de consumo y digestibilidad. Idealmente, estos análisis químicos deberían ser complementados con análisis dinámicos de fermentación ruminal (análisis *in vitro*) para obtener una caracterización más acabada de su valor nutritivo.

El presente trabajo describe brevemente los análisis químicos y técnicas *in vitro* de evaluación de alimentos más difundidos, con particular énfasis en las aplicaciones prácticas de estas técnicas en la alimentación de ganado lechero.

Análisis químicos

Materia seca

Si bien no es considerado un análisis químico *per se*, una correcta determinación del contenido de materia seca de un alimento dado es fundamental, ya que un error en este paso se transfiere al resto de los componentes químicos, los cuales deberían ser expresados sobre base materia seca para permitir comparaciones con otros alimentos. En el caso de forrajes frescos o heno, las opciones para una correcta determinación del contenido de materia seca son variadas, e incluyen el secado en horno a 65° C por 48 h, a 100° C por 24 h, o a 135° C por 3 h (Cherney, 2000). En el caso de los forrajes ensilados, se debería efectuar una corrección por los componentes volátiles producidos durante el ensilaje. En estos casos, se utiliza la destilación con tolueno, método que sin embargo no es muy recomendable debido a su peligrosidad. Una alternativa la constituyen los métodos para corregir la materia seca obtenida en horno a partir de analizar la muestra para productos de fermentación (ácidos grasos volátiles, especialmente).

Fibra

Los sistemas tradicionales para determinar el contenido de fibra en alimentos animales han sido el análisis proximal (método Weende) y el método de los detergentes de Van Soest (Van Soest et al., 1991). Éste último tiene ventajas sobre el primero porque separa a los carbohidratos de acuerdo a su disponibilidad nutricional y hasta puede servir como un predictor de digestibilidad (Van Soest, 1994). La fibra en detergente neutro (FDN) es el residuo remanente después de una solubilización del alimento en detergente neutro. Está compuesta por hemicelulosa, celulosa, lignina, cenizas y proteína ligada, y por esto ha sido comparada con el término “pared celular”. Sin embargo, esta relación no es tal, ya que la pared celular es una estructura biológica muy compleja, mientras que la FDN es un producto analítico con características nutricionales (Jung y Allen, 1995). En algunos casos, las concentraciones de FDN y de pared celular son similares, pero en el caso de las leguminosas la concentración de FDN es mucho menor, debido a que las pectinas (componentes de la pared celular) son solubilizadas por el detergente neutro, no

apareciendo en el residuo. De todas las fracciones fibrosas, la FDN es la que mejor se correlaciona con el consumo voluntario, siendo por esto la fracción más importante dentro de la fibra a considerar. La fibra en detergente ácido (FDA) es el residuo remanente de la solubilización del alimento en detergente ácido. Este detergente provoca la solubilización de los mismos componentes que el detergente neutro más la hemicelulosa. A pesar de las asociaciones estadísticas positivas encontradas entre concentración de FDA y digestibilidad (Weiss, 1994), no existe una base científica sólida que conecte estos dos parámetros (Van Soest et al., 1991).

Concepto de Fibra Efectiva

La fibra efectiva es la fracción del alimento que estimula la actividad de masticación (Allen, 1997). Esta masticación estimula la producción de saliva, la cual contiene bicarbonatos y fosfatos, encargados de neutralizar los ácidos producidos por la fermentación de la materia orgánica. El balance entre la producción de ácidos y la cantidad de saliva secretada es importante para mantener un rumen saludable, con un valor de pH adecuado que prevenga la aparición de enfermedades metabólicas tales como acidosis. La fracción de la materia orgánica total que es fermentada en rumen hará variar los requerimientos de fibra efectiva (Allen, 1997). Sin embargo, el dato del análisis químico de FDN únicamente no es adecuado para balancear dietas de vacas lecheras de alta producción, debido a que distintos tipos de fibra varían en su capacidad estimuladora de la producción de saliva, lo cual estaría relacionada con el tamaño de partícula del forraje. El concepto de fibra físicamente efectiva fue acuñado para relacionar las características físicas del alimento con el pH del rumen a través de la medición del tamaño de partícula del forraje o la actividad de masticación (Mertens, 1997).

Existen métodos rápidos y relativamente precisos para determinar la fibra efectiva de un determinado alimento. Por ejemplo, la Universidad de Pennsylvania (EEUU) desarrolló el “Penn State Separator”, que consiste en tres cajones plásticos dotados de fondos agujereados a distintos tamaños. Los tres cajones se colocan uno arriba del otro, teniendo el de arriba 19 mm de diámetro en sus agujeros, el del medio 8 mm y el de abajo no posee agujeros. La muestra a analizar es pesada en una balanza y colocada en el cajón de arriba. Los cajones deben agitarse manualmente al menos veinte veces, rotándolos un cuarto de vuelta cada cinco agitaciones. Al finalizar la agitación se pesan los residuos que se encuentran en cada cajón. El porcentaje de fibra efectiva se obtiene obteniendo los porcentajes de muestra que quedaron retenidos en los cajones. Se suman los porcentajes que quedaron en los cajones 1 y 2 y se calcula el porcentaje que éstos representan del total (Lammers et al., 1996).

Lignina

La lignina es un polímero sin una estructura definida, que contiene alcoholes (hydroxycinnamyl) y puede contener además ácidos fenólicos y compuestos no fenólicos (Jung y Allen, 1995). La lignina es frecuentemente mencionada como limitando la digestión de la fibra, y a veces de la proteína. Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que el contenido de lignina *per se* no sería responsable de la disminución de la

digestión de la fibra, sino que la acción de la lignina consistiría en reducir el acceso de las enzimas hidrolíticas a la fibra digestible (Jung y Allen, 1995). Existen diversos métodos para estimar los contenidos de lignina de los alimentos, siendo el más conocido el de la digestión en ácido sulfúrico concentrado (72%). Este método ha sido criticado por considerarse que sobreestima la concentración de lignina de los forrajes, debido a que la proteína co-precipita con la lignina (Norman and Jenkins, 1934, citados por Cherney, 2000). El valor de conocer la concentración de lignina de un alimento dado reside en su relación aparente con la digestibilidad o la indigestibilidad de ese alimento (Cherney, 2000). En este contexto, el efecto de la lignina sobre la digestibilidad de la fibra parece ser mayor en gramíneas que en leguminosas (Jung y Allen, 1995), si bien esto puede ser un reflejo del uso del método lignina en detergente ácido (LDA), que subestima la concentración de lignina en gramíneas. En general, a medida que avanza el estado fenológico de un forraje dado, aumenta la concentración de lignina.

Proteína

Los contenidos de nitrógeno totales de una muestra de alimento son generalmente determinados usando alguna variante del método Kjeldhal (Cherney, 2000). Alternativamente, se puede realizar una combustión total en un autoanalizador (AOAC, 1990). El principio básico para estimar el contenido de proteína de una muestra a partir del contenido de N total es que la proteína total contiene un 16% de N. Sin embargo, esto no es siempre así, por lo que Cherney (2000) sugirió la inclusión de un factor de corrección para el contenido de N en la determinación de proteína cruda.

Así planteado, el análisis de proteína cruda es inadecuado para describir la calidad de la proteína (Van Soest, 1994; Cherney, 2000). De acuerdo con Broderick (1994) y Beever y Mould (2000), el análisis de la fracción proteica de un alimento debería describir el grado de contribución de esa proteína a la formación de proteína microbiana y a la cantidad de proteína dietaria que escapa a la degradación ruminal. Existen diversos métodos de fraccionamiento de la proteína dietaria, tales como los descritos por Sniffen et al. (1992) y Licitra et al. (1996), los cuales han sido discutidos por Cherney (2000), a donde se refiere al lector para su más detallada explicación.

Ventajas y desventajas de los métodos químicos

El análisis químico de los alimentos tiene como un objetivo el de proveer información sobre los componentes químicos de los forrajes que influyen la digestión de los alimentos por parte de los rumiantes. Estos análisis tienen como objetivo adicional estimar la digestibilidad del alimento. En términos generales son rápidos, precisos y baratos. Además, no requieren de animales fistulados como donantes de fluido ruminal, lo que los hace deseables a los ojos del público en general.

Sin embargo, los análisis químicos no siempre cumplen con el objetivo de estimar la digestibilidad del alimento, estando en general menos correlacionados con la digestibilidad que otros métodos enzimáticos o microbianos (Cherney, 2000). Posibles razones para esta menor correlación incluyen la ineficacia de los análisis químicos para representar la complejidad de un sistema biológico, y la falta de representación de la

cinética de los procesos de digestión. Es posible entonces que ambos tipos de análisis, los químicos y los microbianos o enzimáticos, continúen siendo usados en combinación en el futuro.

Métodos *in vitro*

Digestibilidad in vitro

El método de fluído ruminal y pepsina de Tilley y Terry (1963) sigue siendo muy popular en nuestros días, debido principalmente a su precisión para predecir la digestibilidad *in vivo* de algunos forrajes (De Boever et al., 1988; Beever y Mould, 2000). La técnica de Tilley y Terry (1963) es un buen ejemplo de un enfoque sistemático a la predicción de la digestibilidad de los alimentos para rumiantes (Beever y Mould, 2000). Sin embargo, esta técnica tiene algunas desventajas. Requiere de la disponibilidad de animales fistulados en rumen como donantes de fluído ruminal, lo cual se ha vuelto cada vez más difícil en países desarrollados. Opciones para sobrellevar este problema son el uso de heces como proveedores de enzimas microbianas (Omed et al., 2000), y preparados de enzimas puras (Jones y Theodorou, 2000). Sin embargo estas técnicas alternativas no están exentas de problemas, ya sea por variabilidad en la composición de las heces o en el tipo y actividad de las enzimas, como en las dificultades de su implementación y aceptación por parte de los nutricionistas y laboratoristas.

Otro de los problemas de esta técnica es la variabilidad en la calidad del fluído ruminal, lo que está relacionado con el tipo de procesado al que se lo somete, tipo y dieta del animal donante, momento de recolección, condiciones de anaerobiosis, pH y temperatura, etc. Sin embargo, estos problemas serían comunes a todas las técnicas que utilizan fluído ruminal. Una opción para compensar por esto sería la inclusión de alimentos “standards” en cada corrida (Tilley y Terry, 1963). Un punto quizás más importante es que el método Tilley y Terry (1963) es un método de “punto final”, esto es, no provee información sobre la cinética del proceso de degradación en el rumen. Este último punto es importante porque dos alimentos pueden tener la misma degradabilidad ruminal después de 48 o 96 horas de incubación, pero la velocidad de degradación de las muestras puede haber sido completamente diferente. El hecho de que un alimento sea fermentado (y degradado) en rumen más rápido debería conducir a un aumento en la tasa de pasaje de ese alimento, lo que redundaría en un aumento en el consumo voluntario del mismo.

Método de la bolsita de nylon

El método de la bolsita de nylon (Ørskov et al., 1980), también llamado *in situ* o *in sacco*, ha recibido mucha atención por parte de los nutricionistas debido en parte a su simplicidad de uso, pero principalmente porque representa un adelanto con respecto al método de Tilley y Terry (1963) ya que describe la cinética de degradación de los alimentos en el rumen. Esta técnica puede también predecir relativamente bien el consumo voluntario y la digestibilidad de un alimento (Ørskov, 2000), y ha contribuido extensivamente a mejorar el entendimiento del aporte de N al rumiante y sus microbios.

Sin embargo, esta técnica tiene severos problemas de reproducibilidad y repetibilidad, existiendo resistencia por parte de distintos laboratorios para estandarizarla. Revisiones bibliográficas recientes (Huntington y Givens, 1995; Noziere y Michalet-Doreau, 2000) han indicado que los resultados obtenidos con esta técnica varían con el tipo de procesamiento de la muestra, el procedimiento usado para lavar y secar los residuos, cantidad de pérdida de partícula, sitio de incubación y secuencia, tipo y dieta de animal huésped, tipo de bolsa y tamaño de poro, extensión de la contaminación microbiana, etc. Estos factores previenen la comparación directa de resultados de diferentes experimentos (Huntington y Givens, 1995).

Noziere and Michalet-Doreau (2000) indicaron que sería conveniente reportar la distribución del tamaño de partícula en lugar del tamaño de la malla de molido, debido a que las partículas molidas contienen diferentes tamaños, los cuales difieren en composición química y características de degradación. Adicionalmente, la técnica no parece adecuada para determinar algunos efectos de la suplementación o la presencia de factores antinutricionales (por ejemplo, taninos), y no es apropiada para caracterizar alimentos solubles o de tamaño de partícula muy pequeño (Ørskov, 2000). Los modelos usados frecuentemente para describir la cinética de degradación de los alimentos o de fracciones de los mismos (Ørskov y McDonald, 1979) describen muy pobremente los perfiles de degradación de N de alimentos altos en N soluble (Givens, 1994). Al contrario del enfoque sistemático de Tilley y Terry (1963), ha habido menos validación de las mediciones obtenidas *in situ* con datos *in vivo*, lo que impide refutar o aceptar los datos sobre fracciones proteicas derivadas de esta técnica (Beever y Mould, 2000). Adicionalmente, intentos de caracterizar la degradabilidad de la FDN y el almidón usando esta técnica han dado resultados variables y muchas veces conflictivos (Beever y Mould, 2000).

Si bien esta técnica cuenta con desventajas como las descritas, ha permitido avanzar en el conocimiento del metabolismo proteico en rumiantes, y continuará siendo una herramienta interesante en ausencia de una alternativa válida.

Sistema ANKOM de digestibilidad

El sistema ANKOM (Daisy II, ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU), ha sido recientemente introducido en el mercado para simplificar la estimación de digestibilidad *in vitro*. Brevemente, el método consiste en digerir muestras de alimentos en bolsas dentro de frascos, los cuales rotan permanentemente dentro de una cámara aislada y mantenida a 39°C. Algunos autores han reportado que la técnica entrega predicciones relativamente precisas de digestibilidad aparente y verdadera (Julier et al., 1999; Vogel et al., 1999). Mould y Nordheim (1998) adaptaron esta técnica para estimar además la tasa de degradación de la materia seca y otras fracciones de los alimentos, retirando bolsas de los frascos a diferentes tiempos de incubación. Esta modificación ha sido adoptada con éxito para evaluar el efecto de aditivos enzimáticos en alfalfa (Colombatto, 2000).

Esta técnica tiene desventajas similares a las descritas para la técnica de la bolsita de nylon. El potencial de pérdida de partículas solubles o simplemente pequeñas

limitan el tipo y procesado de las muestras. Adicionalmente, los efectos asociativos entre alimentos incubados en un mismo frasco de fermentación podrían influenciar los resultados, aunque Holden (1999) no encontró evidencias de ello. A pesar de esto, la técnica ANKOM representa un medio más rápido y más conveniente para determinar la tasa y extensión de la digestión de alimentos *in vitro*. Esta técnica se usa corrientemente en algunas universidades de Estados Unidos para evaluar la calidad del silaje de maíz y formular raciones para vacas lecheras de alta producción (Weiss, W.P. 2002, comunicación personal).

Método de Producción de Gas in vitro

La técnica de producción de gas *in vitro* genera datos de cinética de digestión, pero midiendo la fermentación del alimento en lugar de su desaparición. Esta fermentación se mide a través de la producción de gases, principalmente metano, dióxido de carbono e hidrógeno (Van Soest, 1994). Una ventaja determinante de estos sistemas es que tienen en cuenta los componentes solubles de los alimentos, que desaparecen y son considerados como “degradados” en los métodos *in situ* (Pell y Schofield, 1993). En adición a esto, son menos dependientes de animales fistulados, pueden ser automatizados y así reducir su laboriosidad. Sin embargo estos métodos automáticos son caros y por lo general no pueden albergar a muchas muestras simultáneamente. Por el contrario, los métodos manuales o semi-automatizados tales como el descrito por Mauricio et al. (1999) son más intensivos en cuanto a trabajo pero pueden evaluar gran número de muestras al mismo tiempo. Existe controversia entre los científicos sobre distintos aspectos de la técnica y sus verdaderos alcances (Beever y Mould, 2000; Pell et al., 2000).

Quizás el principal error que se comete cuando se usa la técnica de producción de gas *in vitro* es la asunción que la producción de gas es directamente proporcional a la digestión del sustrato y entonces de su valor nutritivo (Beever y Mould, 2000). Esto no es adecuado porque la producción de gas es dependiente de la composición del sustrato, las poblaciones microbianas y la utilización de hexosas para crecimiento bacteriano. Se ha reportado que los alimentos ricos en precursores de ácido propiónico (por ejemplo aquellos ricos en almidón) producen menos gas que aquellos ricos en precursores de los ácidos acético y butírico (Williams, 2000). La presencia de amoníaco en forrajes ricos en proteína puede hacer decrecer la producción de gas por una reacción con los ácidos grasos volátiles, tal como fue descrito por Schofield (2000). Como consecuencia de esto, Beever y Mould (2000) concluyeron que la producción de gas *in vitro* provee poca información aparte de la estimación de las tasas de fermentación, lo que los llevó a sugerir que los datos obtenidos deberían ser complementados con datos de degradación de los sustratos, perfiles de ácidos grasos volátiles y crecimiento bacteriano, lo que coincide con las recomendaciones dadas por Blümmel et al (1997).

En términos prácticos, esta técnica tiene un gran potencial. Mauricio et al. (1999) describieron una adaptación de la técnica de producción de gas que permitía incubar 336 frascos al mismo tiempo, lo que reducía el tiempo necesario para construir los perfiles de fermentación de diversos alimentos. Con esta técnica, el Departamento de Agricultura de la Universidad de Reading (Inglaterra) ha evaluado y caracterizado alimentos tan

diversos como silaje de maíz (a diferentes estados de madurez, variedad, horas de exposición al aire, tratados o no con aditivos enzimáticos o ácidos, etc.), silaje de pastura, melazas comerciales, raciones totalmente mezcladas, subproductos de la industria hortícola, forrajes tropicales, granos tratados con álcalis, etc. El laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires, por su parte, está poniendo a punto una adaptación nueva, que permitirá evaluar forrajes y silajes frescos, esto es, sin ningún secado previo. La utilización de esta técnica como rutina, complementada con análisis químicos (principalmente FDN, proteína cruda y almidón, dependiendo de la muestra) permitirá entregar una información mucho más precisa al productor lechero, que le ayudará al momento de formular la dieta para sus vacas.

Conclusiones

El análisis químico de los alimentos continuará siendo una parte fundamental del proceso de formulación de raciones para optimizar la producción de leche. Los análisis de fibra, proteína y lignina continuarán siendo de los más importantes, por su asociación con parámetros del valor nutritivo. Dentro de la fracción “fibra” se tiene que tener en cuenta además cuánto de esa fibra estimula la rumia (concepto de fibra efectiva), con el objetivo de prevenir enfermedades nutricionales.

Idealmente, los análisis químicos deberían ser complementados con el estudio de la cinética de digestión del alimento en el rumen. En el futuro, sin embargo, ya no se debería hablar de aportes de “proteína” o “fibra”, sino que los nuevos sistemas de caracterización de alimentos debieran tener como objetivo la predicción del consumo voluntario de ese alimento, la partición de los nutrientes contenidos en ese alimento entre producción de leche y síntesis de tejido corporal, y los rendimientos de grasa butirosa, proteína y lactosa en leche.

Referencias

- Allen, M.S. 1997. *Journal of Dairy Science* 80:1447-1462.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. Vol. I. 15th Edn. AOAC, Arlington, VA, USA.
- Beever, D.E. and F.L. Mould. 2000. Pages 15-42 In Forage Evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Blümmel, M. and P. Bullerdieck. 1997. *Animal Science* 64:71-75.
- Broderick, G.E. 1994. Pages 200-228 In Forage Quality, Evaluation, and Utilization. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA.
- Holden, L.A. 1999. *Journal of Dairy Science* 82:1791-1794.
- Cherney, D.J.R. 2000. Pages 281-300 In Forage Evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Cherney, D.J.R. and D.R. Mertens. 1998. Pages 351-371 In Grass for Dairy Cattle. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Colombatto, D. 2000. PhD Thesis. The University of Reading, UK.
- De Boever, J.L., B.G. Cottyn, J.I. Andries, F.X. Buysse, and J.M. Vanacker 1988. *Animal Feed Science and Technology* 19:247-260.

- Givens, D.I. 1994. Proceedings of the conference on 'Metabolisable protein and forage evaluation'. Society of Chemical Industry, London, UK.
- Huntington, J.A. and D.I. Givens 1995. *Nutrition Abstracts and Reviews (Series B)* 65:65-93.
- Jones, D.I.H. and M.K. Theodorou. 2000. Pages 155-174 In Forage Evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Julier, B., M. Lila, V. Furstoss, V. Travers, and C. Huyghe. 1999. *Animal Feed Science and Technology* 79:239-245.
- Jung, H.G. and M.S. Allen. 1995. *Journal of Animal Science* 73:2774-2790.
- Lammers, B.P., D.R. Buckmasters, and A.J. Heinrichs. 1996. *Journal of Dairy Science* 79:922-928.
- Licitra, G. T.M. Hernández, and P.J. Van Soest. 1994. *Animal Feed Science and Technology* 57:347-358.
- Mauricio, R.M., F.L. Mould, M.S. Dhanoa, E. Owen, K.S. Channa, and M.K. Theodorou. 1999. *Animal Feed Science and Technology* 79:321-330.
- Mertens, D.R. 1994. Pages 450-493 In Forage Quality, Evaluation, and Utilization. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA.
- Mertens, D.R. 1997. *Journal of Dairy Science* 80:1463-1481.
- Mould, F.L. and H. Nordheim. 1998. Pages 329-331 In Occasional Publication No 22. British Society of Animal Science. British Society of Animal Science, Reading, UK.
- Noziere, P. and B. Michalet-Doreau, B., 2000. Pages 233-254 In Farm animal metabolism and nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Omed, H.M., D.K. Lovett, and R.F.E. Axford. 2000. Pages 135-154 In Forage Evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Ørskov, E.R. 2000. Pages 175-188 In Forage Evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Ørskov, E.R., F.D. DeB Hovell, and F.L. Mould. 1980. *Tropical Animal Production* 5:195-213.
- Ørskov, E.R. and I. McDonald. 1979. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 92:499-503.
- Pell, A.N., D.O. Molina, and P. Schofield. 2000. Pages 1-12 In Proceedings of the EAAP Symposium "Gas Production: Fermentation kinetics for feed evaluation and to assess microbial activity", BSAS, Wageningen, The Netherlands.
- Pell, A.N. and P. Schofield. 1993. *Journal of Dairy Science* 76:1063-1073.
- Sniffen, C.J., J.D. O'Connor, P.J. Van Soest, D.G. Fox, and J.B. Russell. 1992. *Journal of Animal Science* 70:356-3577.
- Schofield, P. 2000. Pages 209-232 In Farm animal metabolism and nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. *Journal of the British Grassland Society* 18:104-111.
- Van Soest, P.J., J.B. Robertson, and B.A. Lewis. 1991. *Journal of Dairy Science* 74:3583-3597.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
- Vogel, K.P., J.F. Pedersen, S.D. Masterson, and J.J. Toy. 1999. *Crop Science* 39:276-279.

Williams, B.A. 2000. Pages 189-214 In Forage Evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.

Weiss, W.P. 1994. Pages 644-681 In Forage Quality, Evaluation, and Utilization. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA.