UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

DOSIS ÓPTIMA DEL ÁCIDO GUANIDINOACÉTICO SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL, CRECIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL DE OVINOS EN ETAPA DE FINALIZACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECURIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

M en C. OSCAR VICENTE VAZQUEZ MENDOZA

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México; Junio de 2025

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

DOSIS ÓPTIMA DEL ÁCIDO GUANIDINOACÉTICO SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL, CRECIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LA CANAL DE OVINOS EN ETAPA DE FINALIZACIÓN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECURIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A

M en C. OSCAR VICENTE VAZQUEZ MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem

CODIRECTORA DE TESIS

Dr. Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour

TUTOR

Dr. María Antonia Mariezcurrena Berasain

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México; Junio de 2025

RESUMEN

El ácido guanidinoacético (AGA), un precursor natural de la creatina utilizado en nutrición de monogástricos ha ganado interés en nutrición de rumiantes por su capacidad para optimizar el metabolismo energético y modular la fermentación ruminal. El primer estudio *in vitro* mostró que la eficiencia del AGA depende críticamente de la composición dietética: en dietas con 10% de heno de alfalfa (*Medicago sativa L.*), dosis de AGA de 1500–2000 mg/kg MS incrementaron (P = 0.0002) la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y energía metabolizable (EM), mientras que en dietas con 100% de heno de alfalfa dichas dosis redujeron (P =0.0113) hasta 38% la producción de metano (CH_4). Sin embargo, en dietas con 25–100% de heno de alfalfa, el impacto fue limitado. En él segundo estudio *in vitro* con dietas para ovinos con 85% de concentrado, la adición de AGA en dosis de 500 mg/kg MS incrementó significativamente la producción total de gas sin elevar emisiones de CH_4, mientras dosis de 2500 mg/kg aumentaron el CH_4 respecto al control, evidenciando relaciones cuadráticas en producción de gas y lineales en CH_4 y monóxido de carbono (CO). El AGA también mejoró linealmente la digestibilidad de materia seca y mostró mayor (P < 0.05) tasa de degradación de proteína cruda con dosis de 1000 mg/kg. En el tercer estudio, la validación *in vivo* en corderos de engorda (Suffolk × Dorset) confirmó que dosis de 1000–1500 mg/kg MS de AGA reducen significativamente la fuerza de corte de la carne (24.8–35.3%; P = 0.007) y el colágeno intramuscular (-15.8%; P = 0.010), mejorando la terneza de la carne, mediante reorientación del metabolismo lipídico y reducción lineal de grasa visceral (P = 0.01). Se observó un marcado dimorfismo sexual: machos exhibieron mayor eficiencia alimenticia (+14%; P = 0.006) y desarrollo magro, mientras hembras mostraron mayor retención de cloruro (+1.79 mmol/L; P = 0.015) y contenido graso. Metabólicamente, el AGA mantuvo parámetros séricos estables incluso a 2000 mg/kg de MS, validando su seguridad en alimentación intensiva de corderos. Económicamente, se observó una tendencia cuadrática (P = 0.074) en utilidad bruta, vinculada a mejoras numéricas en rendimiento de canal y peso canal caliente. En conclusión, los efectos del AGA son dependientes de la dosis y la matriz dietética: dosis bajas (~500 mg/kg) mejoran eficiencia fermentativa sin incrementar

los gases de efecto invernadero, mientras dosis medias (1000–1500 mg/kg) potencian calidad de carne y digestibilidad proteica. La dosificación óptima de AGA en dietas para corderos requiere estrategias diferenciadas por sexo y nivel de forraje en la dieta, mientras que para maximizar su rentabilidad es necesario la búsqueda de canales de comercialización premium que valoren atributos cualitativos (suavidad, marmoleo) sobre métricas convencionales de rendimiento (peso, conversión alimenticia) ofreciendo bases para sistemas de producción de carne ovina sostenibles.

Palabras clave: metano, terneza de la carne, digestibilidad, producción de gas, colágeno.

SUMMARY

Guanidinoacetic acid (GAA), a natural creatine precursor used in monogastric nutrition has gained interest in ruminant nutrition for its ability to improve energy metabolism and modulate ruminal fermentation. The first *in vitro* study revealed that GAA efficiency critically depends on dietary composition: in diets with 10% alfalfa hay (*Medicago sativa* L.), GAA doses of 1500–2000 mg/kg dry matter (DM) increased (P = 0.0002) volatile fatty acid (VFA) production and metabolizable energy (ME), whereas in 100% alfalfa hay diets, these same doses reduced (P = 0.0113) methane (CH_4) production by up to 38%. However, in diets with 25–100% alfalfa hay, the impact was limited. In a second *in vitro* study with 85% concentrate diets for sheep, GAA supplementation at 500 mg/kg DM significantly increased total gas production without elevating CH_4 emissions, while doses of 2500 mg/kg increased CH_4 relative to the control, demonstrating quadratic relationships in gas production and linear trends in CH_4 and carbon monoxide (CO). GAA also linearly improved dry matter digestibility and showed higher (P < 0.05) crude protein degradation rates at 1000 mg/kg doses. *In vivo* validation in finishing lambs (Suffolk × Dorset) confirmed that GAA doses of 1000–1500 mg/kg DM significantly reduced meat shear force (24.8–35.3%; P = 0.007) and intramuscular collagen (−15.8%; P = 0.010), enhancing tenderness through lipid metabolism reorientation and linear reduction of visceral fat (P = 0.01). Marked sexual dimorphism was observed: males exhibited

higher feed efficiency (+14%; P = 0.006) and lean development, while females showed greater chloride retention (+1.79 mmol/L; P = 0.015) and fat content. Metabolically, GAA maintained stable serum parameters even at 2000 mg/kg DM, validating its safety in intensive lamb feeding. Economically, a quadratic trend (P = 0.074) in gross profit was linked to numerical improvements in carcass yield and hot weight. In conclusion, GAA effects are dose- and diet-matrix-dependent: low doses (~500 mg/kg) improve fermentative efficiency without increasing greenhouse gases, while medium doses (1000–1500 mg/kg) enhance meat quality and protein digestibility. Optimal GAA dosing in lamb diets requires sex-specific strategies and forage-level adjustments, alongside *premium* marketing channels that value qualitative attributes (tenderness, marbling) over conventional yield metrics (weight, feed conversion). This provides foundations for sustainable sheep production systems.

Keywords: methane, meat tenderness, digestibility, gas production, collagen

CONTENIDO

1. Introducción 1

2. Revisión de literatura 3

2.1 Características fisicoquímicas del ácido guanidinoacético 3

2.2 Modo de acción del ácido guanidinoacético como precursor de creatina . 4

2.3 Uso del ácido guanidinoacético como aditivo nutricional en producción animal 7

2.4 Impacto del ácido guanidinoacético en rumiantes 9

2.4.1 Digestión y metabolismo de proteínas en rumiantes y su relación con el AGA 9

2.4.2 Fermentación ruminal 12

2.4.3 Población microbiana de rumen 12

2.4.4 Efectos del AGA sobre la respuesta productiva en animales de interés zootécnico 13

3. Justificación 15

4. Hipótesis 15

5. Objetivos 15

5.1 Objetivo general 15

5.2 Objetivos específicos 16

6. Material y Métodos 17

6.1 Estudio *in vitro* 1: Efecto de los niveles dietéticos de ácido guanidinoacético sobre la mitigación de la producción de gases de efecto invernadero y el perfil de fermentación ruminal en dietas a base de alfalfa. 17

6.2 Materiales y métodos 17

6.2.1 Tratamientos experimentales 17

6.2.2 Dietas y composición química 17

6.2.3 Fermentación *in vitro* 19

6.2.4 Análisis estadístico 21

6.3 Estudio *in vitro* 2: Efectos del ácido guanidinoacético sobre la fermentación ruminal, digestibilidad y producción de metano en líquido ruminal de ovinos: Análisis dosis-respuesta 22

6.4 Materiales y métodos 22

6.4.1 Tratamientos experimentales y sustrato 22

6.4.2 Incubaciones *in vitro* para los experimentos 1 y 2 24

6.4.3 Sustrato aparente degradado 26

6.4.4 Cálculo de los parámetros de cinética fermentativa 26

6.4.5 Digestibilidad aparente de MS y PC 27

6.4.6 Cálculo de la cinética de degradación 29

6.4.7 Análisis estadístico 29

7. Resultados 30

7.1 Artículo asociado al estudio *in vitro* 1 publicado en la revista *Animals*. La referencia bibliográfica se presenta a continuación: 30

7.2 Artículo asociado al estudio *in vitro* 2 publicado en la revista *Journal of Agriculture and Food Research*. La referencia bibliográfica se presenta a continuación: 53

7.3 Estudio *in vivo*: Efectos del ácido guanidinoacético sobre el desempeño productivo, bioquímica sérica y calidad de la canal y carne en corderos cruzados en fase de finalización 63

7.4 Introducción 65

7.5 Materiales y Métodos 67

7.5.1 Diseño experimental y suplementación dietética 67

7.5.2 Manejo de la alimentación 70

7.5.3 Desempeño productivo 70

7.5.4 Muestreo y análisis de alimentos 70

7.5.5 Recolección y análisis de suero sanguíneo 71

7.5.6 Medición de las características de la canal 72

7.5.7 Composición química de la carne 72

7.5.8 Medición del color de la carne 73

7.5.9 Análisis de pérdidas por cocción y fuerza de corte Warner-Bratzler 73

7.5.10 Pérdidas por goteo y capacidad de retención de agua 74

7.5.11 Análisis económico 75

7.5.12 Análisis estadístico 75

7.6 Resultados 76

7.7 Discusión 87

7.8 Conclusión y recomendaciones 95

7.9 Referencias 95

8. Discusión general 102

9. Conclusiones 103

10. Literatura citada 105

11. Anexo 1. Constancias en participación de congresos. 120

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados del uso de ácido guanidinoacético como aditivo nutrimental en producción animal 14

Cuadro 2. Ingredientes y composición química de las dietas formuladas con diferentes porcentajes de heno de alfalfa (Medicago sativa L.) 18

Cuadro 3. Ingredientes y composición de las dietas utilizadas como sustratos. ... 22

Cuadro 4. Composición y perfil nutricional de las dietas experimentales 68

Cuadro 5. Comportamiento productivo de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 77

Cuadro 6. Efecto por sexo del comportamiento productivo de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 77

Cuadro 7. Características de la canal de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 78

Cuadro 8. Efecto de sexo sobre características de la canal corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 79

Cuadro 9. Calidad de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 80

Cuadro 10. Efecto de sexo sobre la calidad de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 81

Cuadro 11. Parámetros de química sanguínea de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 82

Cuadro 12. Efecto de sexo sobre los parámetros de química sanguínea de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 83

Cuadro 13. Color de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 85

Cuadro 14. Efecto del sexo sobre el color de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 85

Cuadro 15. corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 86

Cuadro 16. corderos alimentados con diferentes niveles de AGA. 87

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ácido guanidinoacético 4

Figura 2. Vía común inter-especies en la síntesis y metabolismo del ácido guanidinoacético (AGA). 6

Figura 3. Digestión y metabolismo de compuestos nitrogenados en rumiantes. ... 11

1. Introducción

El crecimiento de la población mundial y la creciente presión sobre el medio ambiente, incluidos los recursos de la tierra, impulsan mejoras en la productividad y la eficiencia de los sistemas de producción de carne ovina (Arce-Recinos et al., 2021). La sostenibilidad de la industria productora de carne requiere de alta productividad, y todas aquellas prácticas y tecnologías que ayuden a mejorar de la eficiencia de síntesis de proteína muscular deben ser candidatos de investigación he implementación (Arce-Recinos et al., 2021). El ácido guanidinoacético (AGA) es el principal precursor de creatina en el tejido muscular de los vertebrados (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). La creatina es un compuesto que sirve como un reservorio de energía para ayudar a mantener la homeostasis energética dentro del músculo y diariamente debe estarse regenerado, debido a que se ha cuantificado que tiene una tasa de catabolismo de 1.7% del contenido total del cuerpo, donde se transforma en creatinina y se desecha a través de la orina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

La creatina es requerida en animales en crecimiento para soportar la acumulación de tejido muscular, razón por la que se requiere en mayor cantidad en animales jóvenes, que en adultos (Brosnan et al., 2009). La creatina es sintetizada en el hígado por la metilación del AGA a través de acción de S-adenosil metionina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Los rumiantes como otras especies dependen en una alta proporción de la síntesis de novo de la creatina porque su dieta está virtualmente desprovista de creatina, a menos que se usen harina de origen animal en una alta proporción (Khajali et al., 2020). En animales con alta tasa de acumulación de tejido muscular, la creatina puede ser un factor limitante, por lo que la complementación de las dietas de finalización con AGA puede ser un medio efectivo para cubrir deficiencias y optimizar el desempeño (Brosnan et al., 2009; Khajali et al., 2020). Estudios recientes encontraron que la adición de AGA en la dieta para cerdos incrementó la ganancia de peso, eficiencia alimenticia, y producción de carne magra y redujo la grasa dorsal (Jayaraman et al., 2018),

mientras que en pollos la inclusión de AGA mejoró los índices de desempeño productivo como crecimiento, conversión alimenticia y el estado antioxidante (Faraji et al., 2019). En el caso de rumiantes un estudio realizado en toros Angus (S. Y. Li et al., 2020) con dosis crecientes de AGA, en dietas 50% forraje y 50% concentrado, mostraron que las dosis altas (0.6% y 0.9% de la MS) mejoraron significativamente la ganancia de peso y redujeron la conversión. En tanto que en ovinos estudios recientes aplicaron AGA en dosis de 0.05%, 0.075% y 0.1% de la MS y observaron mejoras significativas en ganancia de peso y reducción de la fuerza de corte en la carne (Jin et al., 2024). Datos que concuerdan con J. H. Zhang et al. (2022) quienes aplicaron AGA en dosis de 0.08% de la MS en dietas de ovinos Tan y observaron mejoras en el desempeño productivo.

Es importante considerar que las fuentes actuales de AGA no están protegidas de la degradación ruminal. Speer et al. (2020) reportaron que el AGA de origen sintético actualmente disponible se degrada en el rumen un 51%, consecuentemente el restante 49% puede alcanzar el intestino y ser absorbido. En este contexto, S. Y. Li et al. (2020) encontraron un impacto beneficioso sobre la producción de ácidos grasos volátiles en el rumen, el crecimiento microbiano y la actividad enzimática al utilizar AGA en las dietas de toros Angus. En un sistema de producción de gas *in vitro* Dong et al. (2024) observaron que dosis tan altas como 0.8% de la MS incrementa los parámetros de fermentación ruminal y la abundancia relativa de *Prevotella* and *Prevotellaceae*_UCG-001. Aunque W.-J. Li et al. (2023) observaron que dosis 0.09% de MS fue suficiente para mejorar la producción de gas y digestibilidad de las fracciones de fibra. A pesar de la nueva información generada en años recientes, persisten vacíos de conocimiento cruciales, particularmente concernientes con la interacción del AGA en dietas con diferentes niveles de forraje en la dieta y el efecto la fracción soluble del AGA sobre la producción de gases de efecto invernadero, además que no se ha establecido la dosis óptima para corderos cruzados en finalización con dietas altas en almidón y su impacto sobre las características de la canal, composición química y calidad de la carne, asimismo de la bioquímica sanguínea en respuestas dosis-dependientes.

2. Revisión de literatura

2.1 Características fisicoquímicas del ácido guanidinoacético

El ácido guanidinoacético (AGA) es un substrato intermediario para la biosíntesis de creatina en el cuerpo (Khajali et al., 2020). Aunque también es posible obtenerlo por síntesis química. Las propiedades fisicoquímicas del AGA pueden variar ampliamente dependiendo del pH de la solución disolvente (Vraneš et al., 2017) .

De acuerdo con Khajali et al. (2020), el AGA, también llamado glicociamina, es un cristal blanco con formula química C3H7N3O2 (Figura 1) y peso molecular de 117.108 g por mol, que es estable en las condiciones de temperatura (100 a 190 °C) propias del procesamiento de alimentos para consumo animal como son peletizado y extrusión. Cuando la temperatura de la muestra de AGA rebasa los 190 °C la estructura química del AGA sufre una descomposición térmica y el cristal se derrite cuando la temperatura supera los 284 °C (Ostojic, 2016). Respecto a su solubilidad, estudios con cristalografía de rayos X han demostrado que las moléculas de AGA están en forma zwitteriónica (ion dipolar) en estado acuoso. El AGA tiene un alto grado de estabilidad en agua (Ostojic, 2016), aunque cuando se disuelve, el pH de la solución de AGA tiende a ser neutral. La primera y segunda constantes de disociación (pKa) del AGA son 2.90 y 10.91, respectivamente. Esto indica que, en un pH inferior a 2.9, el AGA se encuentra en forma catiónica, aunque en un pH superior a 10.91 está en forma aniónica (Khajali et al., 2020). La seguridad del AGA y la creatina han sido verificados y en la actualidad se perciben como productos para el cuidado de la salud y son favorecidos por los fisiculturistas (Gonzales et al., 2014).

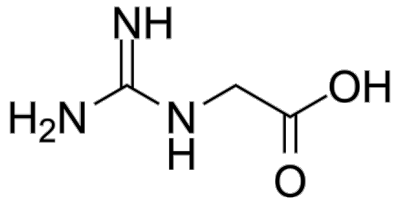


Figura 1. Estructura química del ácido guanidinoacético

2.2 Modo de acción del ácido guanidinoacético como precursor de creatina

Aunque existen diferencias menores entre vertebrados mayores como los mamíferos y los vertebrados menores como las aves, es ampliamente aceptado que el metabolismo del AGA y la creatina se llevan a cabo en los mismos órganos y las reacciones que suceden son catalizadas por las mismas enzimas y los metabolitos siguen la misma ruta a través del riñón, hígado, músculo y otros tejidos (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

La síntesis y metabolismo del AGA se describen a detalle en la Figura 2. El primer paso en el metabolismo del AGA consiste en su síntesis junto con L-ornitina en el riñón cuando la glicina recibe un grupo guanidino de la L-arginina en una reacción bioquímica catalizada por la enzima L-arginina: glicina amidinotransferasa (AGAT) (Khajali et al., 2020). Aunque la mayor parte de la síntesis se lleva a cabo en el riñón, también puede ser sintetizado en otros tejidos como el páncreas, hígado y músculos (Edison et al., 2007). Las fuentes de AGA pueden provenir de la síntesis endógena como se describió anteriormente y de fuentes exógenas a través del alimento (Yan et al., 2021). El valor teórico de homeóstasis del AGA en el cuerpo de humanos adultos saludables es 2.6 ± 0.8 µmol/L (Ostojic et al., 2020). La L-ornitina generada en el proceso entra al ciclo de la urea y se transforma en L-citrulina por catálisis de la enzima ornitina carbamoiltransferasa, en dos reacciones subsecuentes la citrulina se transforma en L-arginina-succinato y finalmente en L-arginina por acción de la enzima argininosuccinato liasa (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

Como segundo paso, el AGA viaja principalmente al hígado vía circulación sanguínea a través de la vena porta (Yan et al., 2021). Aunque también puede tomar lugar en el musculo esquelético, bazo, cerebro y órganos genitales (Nabuurs et al., 2013). En el hígado el AGA y la S-adenosil-metiltransferasa (SAM) son catalizados por la enzima guanidinoacetato N-metiltransferesa (GAMT) en una reacción que combina el AGA y el grupo metilo de la SAM para generar creatina y liberar S-adenosil-homocisteína (SAH) (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000).

Como tercer paso, la creatina es liberada en el torrente sanguíneo y entra a las células, principalmente musculares, a través de transportadores específicos (SLC6A8, cotransportador de creatina Na+/Cl- dependiente) localizados en la membrana celular (Shi et al., 2021). Altos niveles de creatina inducen retroalimentación negativa de AGAT, pero no así de GAMT, entonces la creatina se puede formar a partir de AGA, pero el AGA no se puede sintetizar a partir de creatina (Balestrino & Adriano, 2020), está retroalimentación negativa de la creatina sobre la formación endógena de AGA podría ser superada si el AGA se suplementa a través del alimento (Khalil et al., 2021). En las células, la creatina y el adenosín trifosfato (ATP) sufren una reacción reversible catalizada por la creatina quinasa (CK) para generar fosfocreatina (P-Cr) y adenosín difosfato (ADP) (Joncquel-Chevalier Curt et al., 2015). La P-Cr sirve como reserva rápidamente movilizable de fosfatos de alta energía en el musculo esquelético para reciclar el ATP y reponer los niveles de energía celular (Khajali et al., 2020). Alrededor del 90% de las reservas de creatina en el cuerpo se encuentran en el musculo esquelético (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). La creatina y la P-Cr no solo sirven como un buffer intracelular para el ATP, sino también como un vehículo para el movimiento de fosfatos de alta energía de los sitios de producción en la mitocondria a los sitios de utilización en el citoplasma (Edison et al., 2007). Diariamente el cuerpo metaboliza creatina y P-Cr, y alrededor del 1.7% de estos metabolitos son transformados creatinina, el producto final, el cual se transporta de la sangre a los riñones y se filtra completamente por el glomérulo, se excreta en la orina (Yan et al., 2021). La SAH producida durante la síntesis de creatina puede hidrolizarse reversiblemente a homocisteína y

adenosina. La homocisteína se descompone aún más en cisteína, la cual sufre una reacción de metilación con sus propios donantes de metilo como la vitamina B por catálisis de la enzima metionina sintasa (MS), para finalmente formar metionina que luego participa en la síntesis de creatina nuevamente (Edison et al., 2007).

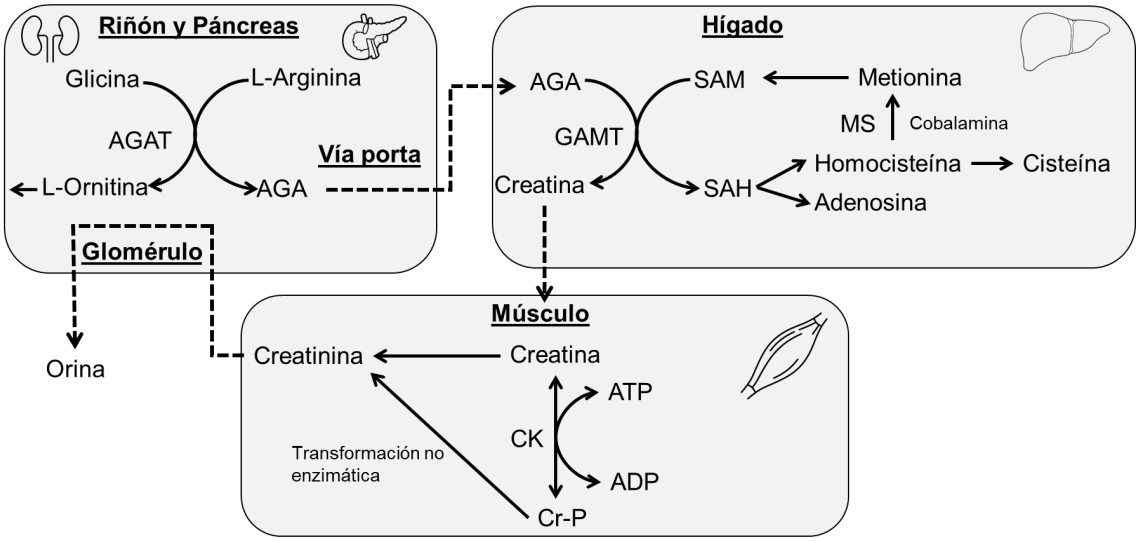


Figura 2. Vía común inter-especies en la síntesis y metabolismo del ácido guanidinoacético (AGA).

El AGA es sintetizado a partir de la glicina y L-arginina, en una reacción catalizada por la enzima AGAT, principalmente en riñones y páncreas. Después transportado a hígado donde recibe un grupo metilo de la SAM en una reacción catalizada por la enzima GAMT para formar creatina y SAH. La SAH puede transformarse en metionina por acción de la MS. En las células musculares la creatina y el ATP sufren una reacción reversible catalizada por la enzima CK para generar P-Cr y ADP. Finalmente, la creatina y la P-Cr no utilizadas se transforman en creatinina y esta es desechada en la orina. Basado en Wyss & Kaddurah-Daouk (2000) y Yan et al. (2021). AGAT: L-arginina: glicina amidinotransferasa; SAM: S-adenosil-L-metionina; SAH: S-adenosil-homocisteína; GAMT: guanidinoacetato N-metiltransferesa; Cr-P: fosfocreatina; CK: creatina quinasa; MS: metionina sintasa; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato. La flecha discontinua representa el torrente sanguíneo.

2.3 Uso del ácido guanidinoacético como aditivo nutricional en producción animal

A inicio de los años 1930 varios investigadores comenzaron la evaluación en animales de diferentes aminoácidos y sustancias relacionadas con el metabolismo de la creatina (Ostojic, 2016). En uno de los primeros estudios se agregó 1 g de AGA en la dieta de ratas jóvenes y observaron que el nivel de creatina se incrementó cerca del 50% y se alcanzó el pico de concentración en las 17 a 24 post suplementación (Yan et al., 2021). Comparado con otras sustancias el AGA promueve un incremento significativo de la creatina, incluso cuando es comparado de forma equivalente con creatina sintética suplementada (Ostojic, 2016). Estos primeros ensayos ayudaron a avanzar nuestro conocimiento sobre la función de AGA en el cuerpo y fueron innovadores para promover el uso de AGA como aditivo para nutrición animal (Ostojic, 2016). El AGA y sus metabolitos, creatina y su forma fosforilada (P-Cr), sirven como una reserva de fosfatos de alta energía rápidamente movilizable en el músculo esquelético para reciclar ATP y reponer niveles de energía (Khajali et al., 2020; Yan et al., 2021). El aporte de energía al musculo es muy importante para animales de alta tasa de crecimiento como pollos de engorda (Khajali et al., 2020), cerdos, bovinos y ovinos. La P-Cr y la CK localizadas en el músculo esquelético interactúan para mantener la homeostasis de energía por la regeneración del ATP a partir de ADP en el citosol y la mitocondria de las células musculares (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). Conocida esta interacción, recientemente se ha usado la relación P-Cr:ATP en pollos de engorda como un indicador de la capacidad amortiguadora de la P-Cr para la hidrolisis de ATP (Khajali et al., 2020). Esto soporta el concepto de que la creatina que llega a los músculos tiene la capacidad de incrementar el crecimiento o el trabajo (Michiels et al., 2012). Un estudio en pollos de engorda demostró que la suplementación con AGA en dosis 0.6 g/kg incremento la relación P-Cr:ATP de 20.3 en el grupo control a 28.4 en el grupo con AGA (Tabatabaei Yazdi et al., 2017). Los efectos consistentes de la suplementación con AGA sobre utilización del alimento pueden ser explicados a través del mejoramiento de la utilización de la energía (Khajali et al., 2020). Como

complemento, el AGA y la creatina también funcionan para promover la secreción del factor de crecimiento insulínico 1 y hormona del crecimiento en el cuerpo, ambas hormonas son anabólicas y pueden aumentar el crecimiento muscular (Farshidfar et al., 2017). En un estudio reciente en bovinos la adición de AGA en dosis de 0.6 g/kg incrementó significativamente el factor insulínico 1 en sangre (Y. J. Liu et al., 2021).

Los métodos o vías en que los animales pueden obtener creatina se pueden categorizar en endógeno y exógeno. El método endógeno ya ha sido descrito a detalle en la Figura 2, pero este no cubre los requerimientos de animales con alta tasa de crecimiento (Yan et al., 2021). Las fuentes exógenas incluyen principalmente proteínas de origen animal como harina de carne y huesos, harina de ave y harina de pescado, mientras que las materias primas vegetales carecen de creatina y su precursor (Khajali et al., 2020). Un problema adicional con las proteínas origen animal es que su contenido de creatina y AGA es muy variable (Khajali et al., 2020). Un análisis de la composición de las harinas de origen animal y su inclusión en las dietas puede mostrarnos que los animales no pueden obtener suficiente creatina a través de la dieta (Yan et al., 2021). Así que solo pueden sintetizar creatina a costa de consumir aminoácidos endógenos, resultando en la pérdida de aminoácidos. En animales jóvenes la arginina es un aminoácido esencial con efecto en el crecimiento, una deficiencia de arginina puede fácilmente reducir la tasa de crecimiento en aves, mientras que adicionar AGA a dietas deficientes en arginina mejora la tasa de crecimiento en pollos. Esto sugiere que el AGA puede ser un buen sustituto de arginina en las dietas (Dilger et al., 2013).

La digestibilidad del AGA suplementado a través del alimento ha sido medida en pollos canulados para permitir la separación de las heces y orina (Tossenberger et al., 2016). Con esta metodología fue determinado que la digestibilidad del AGA varía entre 98 a 99% cuando el AGA se usa en dosis de 0.6 a 6 g/kg (Tossenberger et al., 2016). En ese estudio las pérdidas endógenas de AGA fueron mínimas, entonces existe poca diferencia entre la digestibilidad aparente y la digestibilidad

real (Tossenberger et al., 2016). Lemme et al. (2018) usaron otra metodología para determinar la digestibilidad del AGA donde la digesta fue colectada en la sección terminal del íleon y en excretas, y observaron que la mayor diferencia entre ambos sitios de muestreo es la inclusión de orina en las muestras de excretas. Esta metodología permitió la determinación de pérdidas endógenas de AGA (10 a 36%) y de metabolitos involucrados en el metabolismo del AGA, como la creatina (18 a 35%) y creatinina (18 a 35%) dependiendo del nivel del nivel de L-arginina utilizado en la dieta de pollos (0, 1.6 y 3.2 g/kg de alimento) (Lemme et al., 2018).

Con relación a la disponibilidad del AGA, Lemme et al. (2010) reportaron que la suplementación de AGA a dietas deficientes en metionina no mejoró la eficiencia alimenticia y la utilización de la energía, aunque en dietas con un nivel adecuado de metionina la eficiencia alimenticia fue mejorada (Lemme et al., 2010). Tossenberger et al. (2016) reportaron 76.2% de utilización (retenido en el cuerpo vs. consumo) para AGA suplementado en dosis de 0.6 g/kg, aunque la utilización bajo a 45.6% cuando se usó una dosis diez veces mayor (6 g/kg). Lemme et al. (2018) informaron que la utilización completa de AGA en dietas con deficiencia de L-arginina, mientras que la utilización se redujo al 86% con la suplementación de AGA en dosis de1.2 g/kg y 70 % con AGA suplementado en dosis 1.2 g/kg, pero con un nivel normal de L-arginina en la dieta.

2.4 Impacto del ácido guanidinoacético en rumiantes

2.4.1 Digestión y metabolismo de proteínas en rumiantes y su relación con el AGA

El AGA es un compuesto nitrogenado derivado de aminoácidos, contiene 221% de proteína cruda. En nutrición de rumiantes, el término proteína cruda por definición es el contenido de nitrógeno de un alimento multiplicado por 100/16=6.25 (basado en el hecho de que los aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos contienen alrededor de 16% de nitrógeno). Debido a que el nitrógeno es usado como el índice del contenido de proteína de un alimento o mezcla de alimentos, la proteína cruda

incluye numerosos compuestos tales como nitrógeno no proteico (NNP: urea, biuret, sales de amonio, aminoácidos libres y purinas) y proteína verdadera formada por aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (Owens & Basalan, 2016).

En la digestión del rumiante, las proteínas del alimento son hidrolizadas a péptidos y aminoácidos por las enzimas proteolíticas (proteasas, peptidasas, aminopeptidasas, carboxipeptidasas, ureasas) que producen los microorganismos ruminales, en este proceso degradación algunos aminoácidos son posteriormente transformados en ácidos grasos de cadena corta, amoníaco y bióxido de carbono por el proceso de desaminación. Los principales microorganismos proteolíticos son *Prevotella ruminicola, Ruminobacter amylophilus* algunas especies de *Peptostreptococcus* y protozoarios (McDonald et al., 2011). El amoníaco producido junto con algunos péptidos y aminoácidos libres son los principales constituyentes nitrogenados solubles en el líquido ruminal y son utilizados por los microorganismos del rumen junto con las cadenas de carbono derivadas de los carbohidratos y los aminoácidos desaminados para sintetizar proteína microbiana (McDonald et al., 2011), en nutrición de rumiantes a esta fracción se le conoce como proteína degradable en rumen (PDR). Cuando los microorganismos son llevados al abomaso e intestino delgado, su proteína celular es digerida liberando aminoácidos esenciales y no esenciales que posteriormente el rumiante utilizara para sus diversas funciones fisiológicas (McDonald et al., 2011). La porción de la proteína verdadera de los alimentos que no es fermentada o degradada por el microbiota ruminal es conocida como proteína no degradable en rumen (PNDR), esta porción mantiene su estructura de aminoácidos y es digerida en el intestino delgado (Figura 3) para liberar los aminoácidos por la acción de las enzimas proteasas del rumiante (Saha & Pathank, 2021). En conjunto, la proteína microbiana, proteína verdadera del alimento que escapa de la degradación ruminal y la descamación endógena del rumen (Figura 3) que son digeridos en intestino son definidos como proteína metabolizable (National Academies of Sciences & Medicine, 2021). Esta proteína metabolizable contiene los 20 aminoácidos que componen a las proteínas en general, 9 de los cuales son considerados esenciales, uno es condicionalmente

esencial y el resto son no esenciales (National Academies of Sciences & Medicine, 2021).

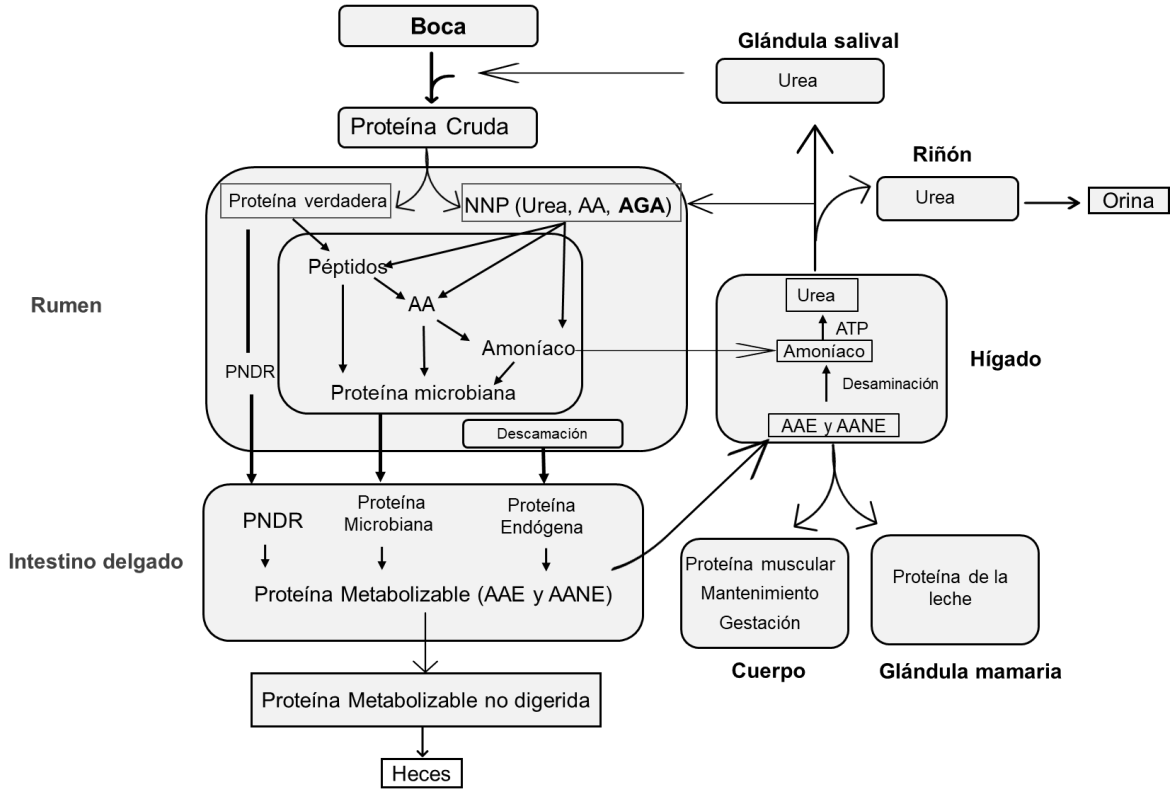


Figura 3. Digestión y metabolismo de compuestos nitrogenados en rumiantes.

Los compuestos nitrogenados pueden provenir de fuentes de proteína verdadera o de suplementos no proteínicos que posterior a su ingreso al rumen pueden ser metabolizados por el microbiota ruminal y ser degradados a péptidos, aminoácidos o amoníaco, y subsiguientemente incorporados en la célula de los microorganismos como proteína microbiana. La proteína microbiana, junto de la proteína verdadera del alimento no degradable en rumen y la descamación endógena, llegan al intestino en forma de proteína metabolizable. Una fracción de la proteína metabolizable puede ser digerida en intestino para liberar aminoácidos esenciales y no esenciales, mientras que la fracción no digerible se desecha en las heces. Los aminoácidos liberados en intestino son absorbidos y llegan al hígado donde pueden ser dirigidos a diversos órganos y sistemas para mantenimiento de funciones vitales y sistema

inmune, formación de masa muscular, en caso hembras, gestación y formación de proteína de la leche. En condiciones de desbalance en el aporte de aminoácidos esenciales, estos se pueden desaminar para convertirse en amoníaco y posteriormente en un proceso que demanda energía transformarse en urea la cual puede ser excretada por orina o ser reciclada a través de la glándula salival y en menor medida a través de la pared del rumen. Basado en McDonald et al. (2011).

AA: aminoácidos; AAE: aminoácidos esenciales; AANE: aminoácidos no esenciales; AGA: ácido guanidinoacético; ATP: adenosín trifosfato; NNP: nitrógeno no proteico; PNDR: proteína no degradable en el rumen.

El metabolismo de la proteína (nitrógeno) refleja la digestibilidad y absorción de la PC en rumiantes (Ren et al., 2022). Estudios recientes han reportado que la suplementación con AGA mejora la retención del nitrógeno en bovinos (Ardalan et al., 2020) y ovinos (Ren et al., 2022). En su estudio Ren et al. (2022) reportaron que la suplementación con AGA redujo el nitrógeno fecal e incrementó tanto el nitrógeno digestible como la síntesis de proteína cruda microbiana.

2.4.2 Fermentación ruminal

La suplementación con AGA en bovinos de engorda (0.6–0.9 g/kg de MS) mejora consistentemente la fermentación ruminal, incrementando el ácido propiónico (15–18%) y los ácidos grasos volátiles totales mientras reduce el nitrógeno amoniacal (NH_3-N) en un 20%, según estudios *in vivo* (S. Y. Li et al., 2020; C. Liu et al., 2021). Paralelamente, se observa una mayor digestibilidad de la materia seca, materia orgánica, proteína cruda, fibra detergente neutro (7.2–9.1%) y fibra detergente ácido, lo que refleja una optimización global de la eficiencia digestiva en dietas de finalización.

2.4.3 Población microbiana de rumen

Estudios *in vivo* en bovinos (S. Y. Li et al., 2020; C. Liu et al., 2021) demostraron que la suplementación con ácido guanidinoacético (AGA) en dosis de 0.3–0.9 g/kg

de materia seca incrementa linealmente poblaciones microbianas clave: bacterias celulolíticas (*Ruminococcus flavefaciens*, *Butyrivibrio fibrisolvens*), proteolíticas (*Prevotella ruminicola*) y amilolíticas (*Ruminobacter amylophilus*), junto con mayor actividad de enzimas como celobiasa, proteasa, xilanasa y α-amilasa. Estos efectos fueron más marcados con 0.6 g/kg de MS, confirmando que el AGA estimula comunidades microbianas funcionales y su actividad digestiva.

Complementariamente, análisis *in vitro* (Dong et al., 2024) revelaron que dosis de 0.2–0.8% de AGA mejoran parámetros fermentativos: aumentan proteína microbiana (PCM) y propionato mientras reducen isovalerato. Además, modifican la estructura microbiana (incremento de *Prevotella* y *Bacteroidota* con 0.8% AGA, aunque disminuye la diversidad) y potencian funciones metabólicas como secreción biliar y digestión proteica, optimizando así la eficiencia ruminal mediante mecanismos dependientes de dosis.

2.4.4 Efectos del AGA sobre la respuesta productiva en animales de interés zootécnico

En la actualidad el AGA es usado como un aditivo nutrimental para aves, cerdos, bovinos y ovinos (Cuadro 1) para mejorar el crecimiento, el rendimiento de la pechuga, reducir las miopatías de la pechuga, reducir la grasa dorsal y la conversión alimenticia e incrementar el rendimiento de la canal (Jayaraman et al., 2018; Khalil et al., 2021; S. Y. Li et al., 2020; Y. J. Liu et al., 2021; Valini et al., 2020; L. S. Wang et al., 2012; S. Zhang et al., 2022), además para ahorrar L-arginina suplementaria (Dilger et al., 2013) y reducir la densidad energética de la dieta (Pirgozliev et al., 2022). La EFSA FEEDAP (2016) estableció que si se aporta un nivel adecuado de donadores de grupos metilo el AGA puede ser suplementado de forma segura en dosis de 1200 mg/kg para pollos y cerdos en engorda. Aunque la dosis mínima en pollos es de 600 mg/kg (EFSA FEEDAP, 2016).

Cuadro 1. Resultados del uso de ácido guanidinoacético como aditivo nutrimental en producción animal

Especie	Compuesto/ dosis, g/kg	Efectos observados	Referencia
Pollos de engorda	AGA/ 0.6	GDP↑, ICA↓, AGA ↔ Arginina	(Dilger et al., 2013)
Pollos de engorda Ross 708	AGA/0.6	GDP↑, ICA↓, SPM↓, AGA en sangre ↑	(Cordova-Noboa et al., 2018)
Pollos de engorda Ross 308	AGA/0.6	GDP↑, ICA↓, energía de la dieta 50 kcal↓, retención de nitrógeno↑	(Pirgozliev et al., 2021)
Cerdos PIC	AGA/1.2 y 2.4	EFA↑	(Valini et al., 2020)
Cerdos Duroc × (Landrace × Yorkshire	AGA/0.8 y 1.2	PC↑, GDP↑, EFA↑, carne magra↑, grasa dorsal↓	(Jayaraman et al., 2018)
Ovinos Kazakh	AGA/ 0.5, 1 y 1.5	Actividad de CK↑, contenido de ATP↑, niveles de P-Cr y ADP↑,	(Zhang et al., 2022)
Ovinos Dorper × thin-tailed Han	AGA/0.9 y BT/5	GDP y EFA ↑, digestibilidad de nutrientes↑	(Ren et al., 2022)
Bovinos Angus	AGA y BT/0.6	PC↑, GDP↑, ICA↓, población de microbiota ruminal↑, acetato en rumen↑, concentración de AGV↑	(C. Liu et al., 2021)
Bovinos Angus	AGA y AFP/0.6	GDP↑, EFA↑, concentración hepática de creatina↑, concentración de AGV en rumen↑, digestibilidad de nutrientes↑, expresión hepática de IGF1↑	(Y. J. Liu et al., 2021)
Bovinos Angus	AGA/0.3,0.6 y 0.9	GDP↑, ICA↓, digestibilidad de nutrientes↓, concentración de AGV↑, propionato↑, nitrógeno amoniacal↓, población bacteriana↑	(Y. J. Liu et al., 2021)
Gallinas ponedoras ISA Brown	AGA/0.5, 1 y 1.5	Postura↑, masa de huevo↑, grosor de cascaron↑, unidades Haugh↑, ATP en hígado↑	(Salah et al., 2020)

AGA: ácido guanidinoacético; AFP: ácido fólico protegido; BT: Betaina; GDP: ganancia diaria de peso; ICA: índice de conversión alimenticia; EFA: eficiencia alimenticia; PC: peso corporal; CK: creatina quinasa; ATP: adenosín trifosfato; ADP: adenosín difosfato; P-Cr: fosfocreatina; AGV: ácidos grasos volátiles; factor de crecimiento insulínico 1; ↑: indica incremento; ↓indica reducción; ↔: indica sustitución.

3. Justificación

El AGA ha sido utilizado años recientes en la producción de carne de cerdo y ave, como precursor para la síntesis de creatina en hígado, promoviendo mejoras en los parámetros de crecimiento, rendimiento en canal y calidad de la carne. Sin embargo, en rumiantes se ha comenzado a explorar su uso, aproximadamente el 51% del AGA exógeno es degradado en el rumen, por lo que es necesario medir el efecto sobre la fermentación ruminal, con especial énfasis en los gases de efecto invernadero. Además, aún no se tiene definida cuál es la dosis óptima en condiciones de corral de engorda, y tampoco si los efectos deseados podrían depender de la disponibilidad de nutrientes donadores de grupos metilo, como la metionina.

Tecnologías alimenticias que ayuden a mejorar la eficiencia de transformación de alimento en carne en ovinos finalizados en corral pueden ayudar a mejorar la rentabilidad del negocio y la sostenibilidad de la industria. Además, pueden ser una alternativa para reducir el uso de agonista β-adrenérgicos en los procesos de finalización y, con ello, contribuir a obtener carne ovina inocua.

4. Hipótesis

La adición de diferentes niveles de AGA en la dieta de corderos en etapa de finalización afecta la fermentación ruminal, mejora los parámetros productivos, y modifica las características de la canal y de la calidad de la carne.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar la dosis optima biológica de AGA como aditivo nutricional que modifica la fermentación ruminal y mejorar el desempeño productivo y las características de la canal y calidad de la carne de corderos en etapa de finalización.

5.2 Objetivos específicos

- Medir la producción de gas total y metano *in vitro* y la digestibilidad de nutrientes *in vitro* de dietas altas, medias o sin en grano cuyo forraje sea heno de alfalfa complementadas con AGA en dosis de 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/kg de MS.

- Medir la producción de gas total y metano *in vitro* y la digestibilidad de nutrientes *in vitro* de dietas altas en grano cuyo forraje sea rastrojo de maíz complementadas con AGA en dosis de 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/kg de MS.

- Realizar un experimento dosis respuesta en ovinos finalizados en corral para determinar la dosis de AGA (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/kg de MS) que optimiza los parámetros de producción como consumo de materia seca, ganancia de peso, conversión alimenticia y características de la canal (rendimiento, grado de engrasamiento, marmoleo, área del ojo de la costilla, grosor de grasa dorsal) y calidad de la carne (composición química, color, pH, fuerza de corte, capacidad de retención de agua, perdidas de peso por cocción y por goteo).

- Medir el efecto de dosis crecientes de AGA (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/kg de MS) sobre la composición química en plasma sanguíneo.

- Hacer un análisis económico para determinar si existe una dosis optima económica de AGA en dietas de corderos en etapa de finalización.

- Evaluar el dimorfismo sexual de corderos involucrados en el estudio *in vivo* sobre todas las variables respuesta antes citadas.

6. Material y Métodos

6.1 Estudio *in vitro* 1: Efecto de los niveles dietéticos de ácido guanidinoacético sobre la mitigación de la producción de gases de efecto invernadero y el perfil de fermentación ruminal en dietas a base de alfalfa.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Tratamientos experimentales

Los factores de estudio fueron el porcentaje de heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) (HA) y la dosis de ácido guanidinoacético (AGA) en la dieta de rumiantes. El porcentaje de inclusión de HA en la dieta se definió para el engorde de ganado bovino y ganado lechero bajo condiciones de pastoreo como 10, 25 y 100% (solo HA), respectivamente. Las dosis de AGA se establecieron con base en estudios previos en rumiantes: 0.0000 (control), 0.0005, 0.0010, 0.0015, 0.0020, 0.0025 y 0.0030 g de AGA por g^{-1} de MS en la dieta, evaluándose un total de 21 tratamientos.

6.2.2 Dietas y composición química

El heno de alfalfa (HA) se obtuvo de un proveedor local en el municipio de Toluca, Estado de México, México. Según la información proporcionada, la alfalfa correspondió a un segundo corte y fue cosechada en etapa de plena floración a 5 cm sobre el nivel del suelo. El AGA se adquirió de Evonik México S.A. de C.V. bajo el nombre comercial GuanAMINO® para rumiantes, con una pureza del 96% al momento de la evaluación.

Tras la preparación de las dietas, se deshidrataron muestras representativas a 60 °C durante 72 h y se molieron en un molino de martillos (Thomas Wiley® Laboratory Mill modelo 4, Swedesboro, NJ, EE. UU.) con tamiz de 1 mm. La composición química se determinó mediante los siguientes análisis: materia seca (#934.01), cenizas (#942.05), nitrógeno (#954.01) y extracto etéreo (#920.39), siguiendo los métodos de la AOAC (1997). La fibra detergente neutra y la fibra detergente ácida

se cuantificaron con un analizador de fibra ANKOM^{200} (ANKOM Technology Corp, Macedon, NY, EE. UU.), utilizando alfa-amilasa y sulfito de sodio según la metodología de Van Soest et al. (1991). La materia orgánica (g kg^{-1} de MS) se estimó restando el contenido de cenizas de 1000, mientras que la proteína se calculó multiplicando el nitrógeno por 6.25. El Cuadro 2 muestra los ingredientes y la composición química de las dietas experimentales formuladas con los diferentes porcentajes de HA.

Cuadro 2. Ingredientes y composición química de las dietas formuladas con diferentes porcentajes de heno de alfalfa (*Medicago sativa L.*)

	Heno de alfalfa %		
	10	25	100
Ingredientes			
Heno de alfalfa	10.0	25.0	100.0
Harina de trigo	18.0	18.0	
Maíz	21.5	6.5	
Salvado de trigo	12.0	12.0	
Gluten de maiz	16.3	16.3	
Harina de soya	7.0	10.0	
Cascarilla de soya	8.1	5.1	
Melaza	7.0	7.0	
Vit/Min	0.1	0.1	
Composición química			
Materia orgánica (g kg^{-}1 MS)	946.3	942.9	969.0
Proteína cruda (g kg^{-}1 MS)	130.9	130.7	155.0
Fibra detergente neutra (g kg^{-}1 MS)	320.7	371.1	535.5
Fibra detergente acida (g kg^{-}1 MS)	149.6	194.3	378.6
Extracto etéreo (g kg^{-}1 MS)	200.5	191.0	18.0

6.2.3 Fermentación *in vitro*

6.2.3.1 Recolección del inóculo y preparación del medio nutritivo

El inóculo se obtuvo de cuatro novillos (420 ± 20 kg de peso vivo) sacrificados en el rastro municipal de Toluca, Estado de México, México. Para la recolección del contenido ruminal y su traslado al laboratorio, se utilizaron termos herméticos. La extracción del líquido ruminal se realizó filtrando el contenido ruminal a través de cuatro capas de gasa, el cual posteriormente se mezcló y se mantuvo a 39 °C hasta su uso. El medio nutritivo contenía solución tampón, macrominerales, microminerales, resazurina y agua destilada, y se preparó siguiendo la metodología descrita por Goering & Van Soest (1970). Antes de la incubación, el inóculo ruminal y el medio nutritivo se mezclaron en una proporción 1:4 (v/v) utilizando un agitador magnético, manteniendo la temperatura a 39 °C.

6.2.3.2 Proceso de incubación

Previo a la incubación, se pesaron 500 mg de cada dieta y se colocaron en un matraz de vidrio con una capacidad de 160 mL; posteriormente, se añadieron las dosis correspondientes de AGA y 50 mL de la solución obtenida del inóculo ruminal y el medio nutritivo. Los frascos se sellaron con tapones de goma butílica y sellos de aluminio, se agitaron y se incubaron en una estufa a 39 °C durante el periodo de evaluación, que en este caso fue de 48 h. Cada tratamiento se incubó por triplicado y se incluyeron tres matraces sin sustrato como blancos para corregir las mediciones de gases.

6.2.3.3 Medición de la producción de gases

El volumen de la producción total de gases (PG) se midió después de 2, 4, 12, 24, 27, 30 y 48 h de incubación, siguiendo la técnica propuesta por Theodorou et al. (1994). utilizando un manómetro digital (Manómetro modelo 407910, Extech® Instruments, Nashua, NH, EE. UU.). El metano (CH_4), monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrógeno (H_2S) se cuantificaron en los mismos intervalos que el gas total, pero con un detector portátil de gases (Dräger X-am®, modelo 2500, Dräger,

Lübeck, SH, Alemania) equipado con una bomba externa (Dräger X-am®, Dräger, Lübeck, SH, Alemania), en el cual se inyectó una cantidad conocida de gas, indicando simultáneamente el porcentaje de cada gas (Acosta et al., 2022). Al finalizar cada medición, el gas acumulado en el espacio de cabeza de los viales fue liberado para evitar la disolución parcial de los gases y estimaciones erróneas (Tagliapietra et al., 2010).

6.2.3.4 pH y degradación de la materia seca

Al finalizar la incubación, el contenido de los viales se filtró siguiendo la metodología descrita por Alvarado-Ramírez et al. (2023), que consistió en retener el sustrato residual en bolsas con 25 µm de porosidad (Filter bags F57, ANKOM Technology Corp, Macedon, NY, EE. UU.) y recolectar el líquido en vasos de precipitación. El pH de los líquidos se midió con un potenciómetro equipado con un electrodo de vidrio (electrodo inalámbrico HALO® modelo HI11102, Hanna® Instruments, Woonsocket, RI, EE. UU.), mientras que el sustrato residual se lavó con abundante agua y se deshidrató a 60 °C durante 48 h para calcular la degradación de la materia seca mediante la diferencia de peso.

6.2.3.5 Cálculos

La cinética de producción de GP, CH_4, CO y H_2S se estimaron mediante el ajuste del volumen de los gases con el procedimiento NLIN de SAS, de acuerdo con el modelo propuesto por France et al. (2000):

$$y = b \times [1 - e^{-c(t-Lag)}]$$

donde:

y = volumen (mL) de GP, CH_4, CO y H_2S en el tiempo t (h);

b = producción asintótica de GP, CH_4, CO y H_2S (mL g^{-1} MS);

c = tasa de producción de GP, CH_4, CO y H_2S (mL h^{-1});

Lag = tiempo de retraso inicial antes del inicio de la producción de GP, CH_4, CO y H_2S (h).

La energía metabolizable (EM; MJ kg^{-1} MS) se estimó de acuerdo con la ecuación propuesta por Menke et al. (1979):

$$ME = 2.20 + (0.136 \times GP) + (0.057 \times CP)$$

donde:
GP = producción total de gas (mL 200 mg^{-1} MS) después de 24 h de incubación;
CP = proteína cruda (g kg^{-1} MS).
Las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta (AGCC; mmol 200 mg^{-1} MS) se calcularon según Getachew et al. (2002):

$$SCFA = (0.0222 \times GP) - 0.00425$$

donde GP = producción total de gas (mL 200 mg^{-1} MS) después de 24 h de incubación. Además, se calcularon las relaciones de CH_4 a AGCC (CH_4: AGCC; mmol $mmol^{-1}$), EM (CH_4: EM; g MJ^{-1}) y MO (CH_4:MO; mL g^{-1}).

6.2.4 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo bifactorial 3 × 7; el factor A correspondió al porcentaje de heno de alfalfa (AH) y el factor B a las dosis de ácido guanidinoacético (AGA), con tres repeticiones por tratamiento. El análisis se realizó utilizando el procedimiento GLM del programa SAS Institute (2002), de acuerdo con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A \times B)(A \times B)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde Yijk es la variable de respuesta, μ es la media general, Ai es el efecto del porcentaje de heno de alfalfa (AH), Bj es el efecto de la dosis de ácido guanidinoacético (AGA), (A × B)ij es el efecto de la interacción entre el porcentaje de AH y la dosis de AGA, y εijk es el error experimental. Se utilizaron contrastes

polinomiales lineales y cuadráticos para evaluar la respuesta de los diferentes porcentajes de AH con el incremento de las dosis de AGA en la dieta. Para la comparación de medias se aplicó la prueba de Tukey, considerando diferencias significativas cuando $P < 0.05$.

6.3 Estudio *in vitro* 2: Efectos del ácido guanidinoacético sobre la fermentación ruminal, digestibilidad y producción de metano en líquido ruminal de ovinos: Análisis dosis-respuesta

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 Tratamientos experimentales y sustrato

Este estudio se realizó en el laboratorio de nutrición animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México y en el laboratorio de nutrición animal del Laboratorio Central de la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, México. El ácido guanidinoacético (AGA; GuanAMINO®, Evonik Operations GmbH, Alemania) utilizado presentó una pureza del 96 %. Las dosis de AGA empleadas en este trabajo se basaron en estudios previos (Z. Li et al., 2021; Vazquez-Mendoza et al., 2023; C. Wang et al., 2020), considerando además la tasa de degradación en el rumen (Speer et al., 2020), y fueron: 0 (AGA0, control), 500 (AGA0.5), 1000 (AGA1), 1500 (AGA1.5), 2000 (AGA2), 2500 (AGA2.5) y 3000 (AGA3) mg/kg de materia seca (MS). Como sustrato, se formuló una dieta para satisfacer los requerimientos de ovinos de engorda (National Research Council, 2007), como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Ingredientes y composición de las dietas utilizadas como sustratos.

Ingredientes	Tasa de inclusión, %MS
Grano de maíz	47.90
Salvado de trigo	23.00
Rastrojo de maíz	15.00

Harina de soya	11.50
Premezcla de vitaminas y minerales[a]	2.00
Carbonato de calcio	0.40
Inerte[b]	0.30
Nutrientes, %MS[c]	
Materia seca, % base húmeda	89.45
Proteína bruta, %	15.84
Fibra bruta, %	11.27
Energía metabolizable, MJ/kg MS[d]	11.35
Energía bruta, MJ/kg MS	18.00
Extracto etéreo, %	3.78
Fibra detergente neutra, %	34.23
Fibra detergente acida, %	14.67
Cenizas, %	6.66
Almidón, %	34.08
Azúcar, %	4.09
Ca, %	0.80
P, %	0.62

MS, materia seca; [d,e] Valores calculados a partir del National Research Council (2007).

[a]El premix vitamínico y mineral proporciona lo siguiente por kg: 240 g Ca; 30 g P; 20 g Mg; 80 g Na; 120 g Cl; 5 g K; 5 g S; 5 mg Cr; 4000 mg Mn; 2000 mg Fe; 5000 mg Zn; 100 mg I; 30 mg Se; 60 mg Co; 500 000 UI de vitamina A; 150 000 UI de vitamina D; 1 000 UI de vitamina E. [b]El componente inerte fue bentonita y la inclusión de ácido guanidinoacético en la dieta se realizó a expensas del componente inerte.

[c]Medición de nutrientes por NIRs con calibración AMINONIR® FEEDS, Evonik Operations GmbH.

Las muestras de dieta se secaron a 65 °C durante 48 horas en una estufa de aire forzado y posteriormente se molieron en un molino Wiley (Thomas Wiley® Laboratory Mill modelo 4, Swedesboro, NJ, EE. UU.) con un tamiz de 1 mm y se almacenaron en frascos plásticos para su posterior determinación de composición química e incubación in vitro. El análisis químico de las dietas se realizó mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) utilizando un espectrofotómetro (FT-NIR TANGO®, Bruker Optik GmbH, Alemania) equipado con curvas de calibración para

alimentos terminados para rumiantes (AMINONIR® FEEDS, Evonik Operations GmbH, Alemania) para la determinación de materia seca, cenizas, proteína cruda (contenido de N multiplicado por 6.25), extracto etéreo, fibra cruda, fibra detergente neutra, fibra detergente ácida, almidón, azúcares, fósforo y energía bruta, y todas las calibraciones se basan en métodos oficiales (AOAC, 1997; Van Soest et al., 1991).

6.4.2 Incubaciones *in vitro* para los experimentos 1 y 2

En el experimento 1, el inóculo ruminal se recolectó de 4 ovejas Pelibuey de 40 kg ± 2 kg, alimentadas con una dieta a base de maíz molido, harina de soya, premix vitamínico-mineral y rastrojo de maíz, con una proporción forraje: concentrado de 50:50. El líquido ruminal se recolectó en un termo y se transportó inmediatamente al laboratorio, filtrándose a través de cuatro capas de gasa y almacenándose en un matraz Erlenmeyer de 2000 mL dentro de un baño maría a 39 °C bajo flujo constante de CO_2. El medio nutritivo contenía solución tampón, macrominerales, microminerales, resazurina y agua destilada (Menke & Steingass, 1988), en una proporción 9:1 (v/v), mezclándose con un agitador magnético y manteniendo la temperatura a 39 °C. Previo a la incubación, se pesaron 1000 mg de sustrato y se colocaron en un frasco de vidrio de 160 mL; posteriormente, se añadieron las dosis de AGA, 90 mL de solución nutritiva y 10 mL de inóculo ruminal, manteniendo la relación 9:1 (v/v). Los frascos, bajo flujo de CO_2, se sellaron inmediatamente con tapones de goma y cápsulas de aluminio, se agitaron y se colocaron en un baño termorregulado con agitación (Forma Scientific Model 2564 Shaker Bath, Division of Mallincrodt. Inc. OH, EE. UU.) a 39 °C (Theodorou et al., 1994). Cada tratamiento, incluido el control (AGA0), se incubó por cuadruplicado, y se utilizaron tres frascos sin sustrato como blancos para corregir las mediciones de gas. Todos los tratamientos se manejaron bajo idénticas condiciones experimentales, utilizando el mismo lote de inóculo ruminal. La temperatura se monitoreó continuamente durante el periodo de incubación, y los frascos permanecieron sellados para mantener condiciones anaerobias (verificado mediante la decoloración de la resazurina). Los

valores de producción total de gas de los frascos blancos se restaron de las mediciones de los tratamientos. La producción total de gas (PG) se registró a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 30, 48, 60 y 72 horas utilizando un transductor de presión (Manómetro Delta OHM® modelo HD2124.1, Seneca Italy Srl. Italia) (Mauricio et al., 1999).

En el experimento 2, el inóculo ruminal se obtuvo de 2 ovejas (45 ± 2 kg) sacrificadas en el rastro municipal de Toluca, Estado de México, México. El líquido ruminal se colocó en un termo y se transportó al laboratorio, donde se filtró a través de cuatro capas de gasa y se mantuvo a 39 °C hasta su uso. El medio nutritivo estaba compuesto por una solución tampón, macro y microminerales, resazurina y agua destilada (Goering & Van Soest, 1970). Antes de la incubación, el inóculo ruminal y el medio nutritivo se mezclaron en una proporción 1:4 (v/v) bajo agitación constante y se mantuvieron a 39 °C. Para la incubación, se pesaron 500 mg de cada dieta y se colocaron en frascos de vidrio de 120 mL junto con las dosis de AGA y 50 mL de la mezcla de medio nutritivo con inóculo ruminal. Los frascos se cerraron inmediatamente con tapones de goma y sello de aluminio y se colocaron en un baño maría (BINDER Incubator Model FD115, Alemania).

Cada tratamiento, incluido el control (AGA0), se incubó por triplicado, y se utilizaron tres frascos sin sustrato como blancos para corregir la medición de gases. Todos los tratamientos se manejaron bajo condiciones experimentales idénticas, utilizando el mismo lote de inóculo ruminal. La temperatura se monitoreó de manera continua durante todo el periodo de incubación, y los frascos permanecieron sellados para mantener condiciones anaerobias. Los valores de producción de gases (PG, CH_4, CO y H_2S) de los frascos blancos se restaron de todas las mediciones de los tratamientos. La producción total de gas (PG) se registró a las 2, 4, 12, 24, 27, 30 y 48 horas utilizando un transductor de presión (Manómetro modelo 407910, Extech® Instruments, Nashua, NH, EE. UU.). Además, la producción de metano (CH_4), monóxido de carbono (CO) y sulfuro de hidrógeno (H_2S) en el espacio superior de los frascos se cuantificó utilizando un detector portátil de gases por difusión (Dräger

X-am®, modelo 2500, Dräger, Lübeck, SH, Alemania) en los mismos tiempos que la PG. Después de cada medición, en ambos experimentos, el gas acumulado en el espacio de superior de los frascos se liberó para evitar la disolución de los gases en la fase líquida y disminuir la fuente de error (Tagliapietra et al., 2011).

6.4.3 Sustrato aparente degradado

En ambos experimentos, después de recolectar el sobrenadante para determinar el pH mediante un pH-metro (Conductronic pH15, Puebla, México), el contenido de cada frasco se filtró al vacío utilizando crisoles de vidrio sinterizado (Duran® porosidad gruesa no. 1, tamaño de poro 100–160 µm; Alemania). Los residuos de incubación se secaron luego a 100 °C durante 12 horas para estimar la desaparición aparente de materia seca (DAMS). La degradabilidad de la materia seca a las 72 horas de incubación se calculó como la diferencia entre el contenido de MS del sustrato y su MS no degradable (Mauricio et al., 1999).

6.4.4 Cálculo de los parámetros de cinética fermentativa

Para estimar los parámetros cinéticos de producción de gas (PG) en el experimento 1, y de CH_4, CO, O_2 y H_2S en el experimento 2, los resultados de GP, CH_4, CO y H_2S (mL g^{-1} MS) se ajustaron mediante la opción NLIN de SAS (2012) utilizando un modelo no lineal (France et al., 1993):

$$A = b \times (1 - e^{-c(t-Lag)})$$

donde A es el volumen de PG, CH_4, CO y H_2S en el tiempo t; b es la producción asintótica de gas, CH_4, CO y H_2S (mL/g MS); c es la tasa de producción de GP, CH_4, CO y H_2S (/hora), y *Lag* (hora) es el tiempo de retraso o colonización antes de que inicie la producción de gas, CH_4, CO y H_2S.

La energía metabolizable (EM) se calculó a partir de la PG de 200 mg del sustrato

y del contenido de proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas (CEN) del sustrato (Menke & Steingass, 1988):

$$AGCC\ \left(\frac{mmol}{200\ mg\ MS}\right) = 0.0222\ PG24 - 0.00425$$

Donde PG24 es la producción neta de gas en mL de 200 mg de muestra seca después de 24 horas de incubación.

La concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) se calculó a partir de PG24 (Getachew et al., 2002) de la siguiente manera:

donde PG24 es la producción neta de gas a las 24 horas (mL/200 mg MS).

La materia orgánica digestible (MOD) también se calculó a partir de GP24 utilizando la siguiente fórmula (Menke et al., 1979):

$$MOD\ (\%\ MS) = 13.3\ \times PG24\ - 0.05PG24^2 + 511\ \times CP\ + 76\ \times EE\ + 91.2$$

donde PG es la producción neta de gas en mL de 200 mg de muestra seca después de 24 horas de incubación, y todos los valores de PC y EE se expresaron en g/100 g de MS.

6.4.5 Digestibilidad aparente de MS y PC

Se empleó la técnica de bolsas de nailon (Ørskov & McDonald, 1979) con modificaciones metodológicas propuestas por la Corporación Tecnológica ANKOM (Tassone et al., 2020) y adaptaciones que consistieron en el uso de frascos de vidrio de 900 mL equipados con una válvula de fermentación individual (sistema de cierre hidráulico) y tapón de goma (Home Brew Ohio, EE. UU.) en la tapa para permitir la liberación de gases generados durante la fermentación. Se utilizaron bolsas de filtración ANKOM (F57, ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, EE. UU.), identificadas con lápiz y previamente secadas a 60 °C hasta peso constante. Se

pesaron 450 mg de sustrato seco y se colocaron en las bolsas junto con las dosis de AGA, en triplicado para cada tiempo evaluado. Las bolsas se sellaron con una selladora térmica (Impulse Sealer, ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, EE. UU.) y se introdujeron en los frascos de digestión adaptados (16 bolsas por frasco). El inóculo ruminal se obtuvo por vía esofágica de seis corderos en crecimiento (Pelibuey, 24 ± 0.3 kg de peso corporal) alimentados con una dieta basada en maíz molido, pasta de soya, premix vitamínico-mineral y rastrojo de maíz, con una relación forraje: concentrado de 50:50.

El líquido ruminal recolectado se colocó en un termo y se llevó inmediatamente al laboratorio, donde se filtró a través de cuatro capas de gasa y se almacenó en un matraz Erlenmeyer de 2000 mL en un baño maría a 39 °C con flujo constante de CO_2 hasta su uso. El medio nutritivo consistió en una solución tampón, macro y microminerales, resazurina y agua destilada (Menke & Steingass, 1988). Se inoculó una bolsa vacía en cada matraz, la cual sirvió como blanco para corregir los datos. Posteriormente, se añadieron 800 mL de una mezcla 1:4 (v/v) de líquido ruminal y medio nutritivo a cada matraz de fermentación. Se utilizaron siete matraces, uno por cada dosis de AGA, y se colocaron en una incubadora de baño maría con agitación circular constante (SHELDON MANUFACTURING INC. Cornelius, OR, EE. UU.) a 39.2 ± 0.5 °C. Las bolsas se incubaron durante 48 horas. Las bolsas por triplicado de cada tratamiento se retiraron de los matraces a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas, se lavaron con agua y luego se deshidrataron en una estufa de aire forzado a 65 °C hasta peso constante para determinar la materia seca residual. Finalmente, el contenido de proteína cruda se determinó multiplicando el contenido de nitrógeno por un factor de 6.25, y el nitrógeno (954.01) se midió utilizando el método Kjeldahl (AOAC, 1997). Con estos datos, la digestibilidad aparente de la materia seca y de la proteína cruda se calculó de acuerdo con las fórmulas propuestas por Tassone et al. (2020).

6.4.6 Cálculo de la cinética de degradación

Los datos de desaparición de MS y PC de los siete tratamientos en los cinco tiempos de incubación de las bolsas se utilizaron para calcular la cinética de degradación mediante un modelo no lineal (Ørskov & McDonald, 1979):

$$\mathrm{P} = \mathrm{a} + \mathrm{b}\,(1 - exp^{-cxt})$$

Donde:

P, es la degradabilidad potencial; t, es el tiempo de incubación; a, es un intercepto con el eje y en el tiempo cero representa el sustrato soluble y totalmente degradable que abandona rápidamente la bolsa ANKOM; b, es la diferencia entre el intercepto (a) y la asíntota, que representa la fracción insoluble pero potencialmente degradable del sustrato, degradada por los microorganismos mediante un proceso cinético de primer orden; c, es la constante de la tasa de degradación de la fracción b.

Las ecuaciones se ajustaron para los perfiles de degradación utilizando el procedimiento NLIN de SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012).

La degradabilidad efectiva de la fracción b (DEb) de MS y PC se calculó mediante métodos numéricos utilizando la función Solver del programa Microsoft Office Excel (Correa, 2009).

6.4.7 Análisis estadístico

El diseño de los tres experimentos siguió un diseño completamente al azar bajo condiciones controladas de laboratorio. Previo al análisis, los datos se evaluaron para normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk ($P > 0.05$) y para homocedasticidad mediante la prueba de Bartlett ($P > 0.05$). Los datos de las cuatro réplicas para producción total de gas y las tres réplicas de CH_4, CO, H_2S, digestibilidad aparente y cinética de degradación se promediaron para cada tratamiento en cada corrida, sirviendo como unidad experimental. El análisis se

realizó utilizando el procedimiento GLM de SAS Institute Inc. (2012) con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Yijk es la variable de respuesta, μ es la media general, Ai es el efecto de los niveles de GAA (i = 0 (control), 500, 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 mg/kg), y εijk es el error experimental, el cual se asume distribuido normalmente con media cero y varianza constante. Las medias de los tratamientos se compararon utilizando la prueba de Tukey (HSD), considerando significancia estadística cuando P ≤ 0.05. Se evaluaron tanto los efectos lineales como cuadráticos del incremento en los niveles de AGA y se reportaron sus respectivos valores de P. Para las variables que mostraron efectos cuadráticos significativos, la dosis óptima se calculó derivando la ecuación cuadrática e igualando la primera derivada a cero.

7. Resultados

7.1 Artículo asociado al estudio *in vitro* 1 publicado en la revista *Animals*. La referencia bibliográfica se presenta a continuación:

Vazquez-Mendoza, O.V.; Andrade-Yucailla, V.; Elghandour, M.M.M.Y.; Masaquiza-Moposita, D.A.; Cayetano-De-Jesús, J.A.; Alvarado-Ramírez, E.R.; Adegbeye, M.J.; Barros-Rodríguez, M.; Salem, A.Z.M. Effect of Dietary Guanidinoacetic Acid Levels on the Mitigation of Greenhouse Gas Production and the Rumen Fermentation Profile of Alfalfa-Based Diets. Animals 2023, 13, 1719. https://doi.org/10.3390/ani13111719

animals

MDPI

Article

Effect of Dietary Guanidinoacetic Acid Levels on the Mitigation of Greenhouse Gas Production and the Rumen Fermentation Profile of Alfalfa-Based Diets

Oscar Vicente Vazquez-Mendoza [1], Veronica Andrade-Yucailla [2], Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour [1], Diego Armando Masaquiza-Moposita [3], Jorge Adalberto Cayetano-De-Jesús [1], Edwin Rafael Alvarado-Ramírez [4], Moyosore Joseph Adegbeye [5], Marcos Barros-Rodríguez [6] and Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem [1,*]

1 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50295, Mexico; osvam2009@gmail.com (O.V.V.-M.); mmohamede@uaemex.mx (M.M.M.Y.E.); adal_cay@hotmail.com (J.A.C.-D.-J.)
2 Centro de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Estatal Península de Santa Elena, La Libertad 240204, Ecuador; crisita_2725@hotmail.com
3 Facultad de Ciencias Pecuarias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Sede Orellana, El Coca 220150, Ecuador; dmasaquiza@espoch.edu.ec
4 Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Universidad Autónoma de Tamaulipas, El Mante 89840, Mexico; win.rmz@hotmail.com
5 Department of Animal Production and Health, Federal University of Technology, Akure 340110, Nigeria; alanspeco@yahoo.com
6 Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Cevallos 1801334, Ecuador; ma_barrosr@yahoo.es
* Correspondence: salem@uaemex.mx

check for updates

Citation: Vazquez-Mendoza, O.V.; Andrade-Yucailla, V.; Elghandour, M.M.M.Y.; Masaquiza-Moposita, D.A.; Cayetano-De-Jesús, J.A.; Alvarado-Ramírez, E.R.; Adegbeye, M.J.; Barros-Rodríguez, M.; Salem, A.Z.M. Effect of Dietary Guanidinoacetic Acid Levels on the Mitigation of Greenhouse Gas Production and the Rumen Fermentation Profile of Alfalfa-Based Diets. *Animals* **2023**, *13*, 1719. https://doi.org/10.3390/ani13111719

Academic Editor: Alejandro Plascencia

Received: 10 April 2023
Revised: 12 May 2023
Accepted: 13 May 2023
Published: 23 May 2023

Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Simple Summary: Alfalfa (*Medicago sativa* L.) is considered the queen of forages, and hay is an important source of protein and fiber for livestock, while guanidinoacetic acid (GAA) is a feed additive that can improve growth performance and energy metabolism in animals and reduce the population of methanogenic microorganisms. However, the percentage of alfalfa hay (AH) in the diet can cause variations in greenhouse gas (GHG) production, the rumen fermentation profile and methane (CH_4) conversion efficiency, which, in turn, influences the effectiveness of GAA. In this regard, this study demonstrates that the percentage of AH in the diet affects the effectiveness of GAA and that the addition of GAA in diets with 25 and 100% AH presents low effectiveness, a diet with 10% AH can improve the mitigation of GHG and the rumen fermentation profile without compromising the CH_4 conversion efficiency using a dose of 0.0015 or 0.0020 g GAA g^{-1} DM in the diet.

Abstract: The objective of this study was to evaluate the effect of different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay (AH) and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet on the mitigation of greenhouse gas production, the in vitro rumen fermentation profile and methane (CH_4) conversion efficiency. AH percentages were defined for the diets of beef and dairy cattle, as well as under grazing conditions (10 (AH10), 25 (AH25) and 100% (AH100)), while the GAA doses were 0 (control), 0.0005, 0.0010, 0.0015, 0.0020, 0.0025 and 0.0030 g g^{-1} DM diet. With an increased dose of GAA, the total gas production (GP) and methane (CH_4) increased ($p = 0.0439$) in the AH10 diet, while in AH25 diet, no effect was observed ($p = 0.1311$), and in AH100, GP and CH_4 levels decreased ($p = 0.0113$). In addition, the increase in GAA decreased ($p = 0.0042$) the proportion of CH_4 in the AH25 diet, with no influence ($p = 0.1050$) on CH_4 in the AH10 and AH100 diet groups. Carbon monoxide production decreased ($p = 0.0227$) in the AH100 diet with most GAA doses, and the other diets did not show an effect ($p = 0.0617$) on carbon monoxide, while the production of hydrogen sulfide decreased ($p = 0.0441$) in the AH10 and AH100 diets with the addition of GAA, with no effect observed in association with the AH25 diet ($p = 0.3162$). The pH level increased ($p < 0.0001$) and dry matter degradation (DMD) decreased ($p < 0.0001$) when AH was increased from 10 to 25%, while 25 to 100% AH contents had the opposite effect. In addition, with an increased GAA dose, only the pH in the AH100 diet increased

($p = 0.0142$ and $p = 0.0023$) the DMD in the AH10 diet group. Similarly, GAA influenced ($p = 0.0002$) SCFA, ME and CH_4 conversion efficiency but only in the AH10 diet group. In this diet group, it was observed that with an increased dose of GAA, SCFA and ME increased ($p = 0.0002$), while CH_4 per unit of OM decreased ($p = 0.0002$) only with doses of 0.0010, 0.0015 and 0.0020 g, with no effect on CH_4 per unit of SCFA and ME ($p = 0.1790$ and $p = 0.1343$). In conclusion, the positive effects of GAA depend on the percentage of AH, and diets with 25 and 100% AH showed very little improvement with the addition of GAA, while the diet with 10% AH presented the best results.

Keywords: alfalfa; carbon monoxide; enteric methane; guanidinoacetic acid; hydrogen sulfide; rumen fermentation

1. Introduction

In recent years, the warming of the Earth has increased as a consequence of the increase in the concentration of greenhouse gases (GHGs) in the atmosphere, which has also caused instability in environmental conditions, especially in rainfall and atmospheric temperature [1]. According to the FAO, livestock farming is responsible for around 18% of methane (CH_4) emissions and 9% of carbon dioxide (CO_2) production [2], as these gases are the result of ruminal fermentation of feed, mainly from fibrous carbohydrates; and although their production is inevitable, high amounts represent a loss of gross energy of between 2 and 12% for the animals [3]. Other gases produced by rumen include carbon monoxide (CO), which indirectly contributes to global warming as a precursor to ozone, and hydrogen sulfide (H_2S) [4], can provide an alternate sink for metabolic hydrogen (H_2), which decreases CH_4 production [5]. However, H_2S is easily absorbed in the intestinal wall of ruminants, so in high concentrations, it can be toxic and even induce polioencephalomalacia, a harmful brain disease in animals [6]. Consequently, the need has arisen to propose novel and rapid strategies for the mitigation of GHGs of animal origin [7].

High-quality and digestible feed has been considered as an option to reduce GHG emissions by enabling increased production of short-chain fatty acids (SFCA) and an increase the energy supply in animals [8], which would be reflected in higher animal performance. In this sense, alfalfa (*Medicago sativa* L.), also called the "queen of forages", is a perennial legume that is widely cultivated [9] and is considered a source of protein for ruminants [10], since it has a high protein content with a rapid degradation rate and a high proportion of rapidly degrading protein [11]. As a forage crop, alfalfa is not only rich in protein but also in vitamins and some minerals, with high palatability, making it a viable alternative to be used in ruminant diets [12,13]. In this regard, it has been reported that alfalfa can improve the characteristics and quality of the carcass in sheep and even equal or exceed the quality of sheep fed with concentrate, since the animals fed with alfalfa have presented with a high concentration of linoleic acid, which has benefits for human health [14,15]. Other studies reported that the inclusion of alfalfa hay (AH) in lamb feed delayed lipid oxidation and myoglobin formation in meat, thereby prolonging meat shelf life [16]. In addition, alfalfa presents secondary metabolites such as phenols, flavonoids and saponins [17]; therefore, it also represents an important source of bioactive compounds [18]. However, forages preserved by tedding have lower protein digestibility compared to their fresh or ensiled form [19], and these changes may influence the abundance of the microbial population, which, in turn, affects feed kinetics, digestibility, GHG emissions and fermentation end products [20].

The use of feed additives has also been considered as an alternative, with improved growth performance of animals, GHG emissions per unit of animal product decrease. Guanidinoacetic acid (GAA) is an additive that is naturally biosynthesized from arginine and glycine in the kidneys or pancreas of vertebrates and is a direct precursor of creatine biosynthesis [21,22], which is why it participates in energy metabolism and is used in animal feed, including that of ruminants [23]. In bulls, it has been reported that GAA

increases the microbial population and improves the rumen fermentation profile and nutrient digestibility without altering blood biochemistry parameters [8,24]. Meanwhile, in sheep, performance, carcass characteristics and meat nutritional content have been reported to improve in association with GAA [25,26]. Other studies reported that GAA in ruminants increased daily weight gain, feed conversion efficiency and total short-chain fatty acid (SCFA) production [27]. However, the doses of GAA vary across studies, and the reported effects show variability. Therefore, considering that the GAA doses used in the previous studies were tested with a diet containing a forage source other than AH and given the benefits of AH for ruminant nutrition, we hypothesized that the percentage of AH in the diet can affect the level of response of GAA to the parameters of rumen digestibility and the final products of fermentation. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of different percentages of AH and doses of GAA in the diet on the mitigation of the production of greenhouse gases (CH_4, CO and H_2S), the in vitro ruminal fermentation profile and the CH_4 conversion efficiency.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Treatments

The study factors were the percentage of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay (AH) and the dose of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet of ruminant livestock. The percentage of inclusion of AH in the diet was defined for beef cattle fattening and dairy cattle under grazing conditions as 10, 25 and 100% (only AH), respectively. The doses of GAA were based on previous studies in ruminants: 0.0000 (control), 0.0005, 0.0010, 0.0015, 0.0020, 0.0025 and 0.0030 g GAA g^{-1} DM diet, for which they were evaluated in a total of 21 treatments.

2.2. Diets and Chemical Composition

The AH was obtained from a local business in the municipality of Toluca, State of Mexico, Mexico, and according to the information provided by the seller, the alfalfa was second cut and was harvested in the full-bloom stage at 5 cm above ground level. GAA was purchased from Evonik México S.A. de C.V. under the trade name of GuanAMINO® for ruminants, and at the time of evaluation, it had a purity of 96%. Once the diets were prepared, representative samples were dehydrated at 60 °C for 72 h and crushed in a hammer mill (Thomas Wiley® Laboratory Mill model 4, Swedesboro, NJ, USA) with a 1 mm sieve, and the chemical composition was determined. The analysis included the estimation of dry matter (#934.01), ash (#942.05), nitrogen (#954.01) and ethereal extract (#920.39) according to the description of the AOAC [28], while the determinations of neutral detergent fiber and acid detergent fiber were performed using an ANKOM^{200} fiber analyzer (ANKOM Technology Corp, Macedon, NY, USA) with alpha-amylase and sodium sulfite according to the methodology proposed by Van Soest et al. [29]. Organic matter was estimated (g kg^{-1} DM) by subtracting the ash content from 1000, while protein was estimated by multiplying the nitrogen content by 6.25. Table 1 shows the ingredients and the chemical composition of the experimental diets formulated with the different percentages of AH.

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diets formulated with different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay.

Item	Alfalfa Hay (%)		
	10	25	100
Ingredients			
Alfalfa hay	10.0	25.0	100.0
Wheat meal	18.0	18.0	
Maize	21.5	6.5	
Wheat bran	12.0	12.0	
Gluten feed	16.3	16.3	
Soybean meal	7.0	10.0	
Soybean husk	8.1	5.1	
Molasses	7.0	7.0	
Vit/Min	0.1	0.1	
Chemical composition			
Organic matter (g kg^{-1} DM)	946.3	942.9	969.0
Crude protein (g kg^{-1} DM)	130.9	130.7	155.0
Neutral detergent fiber (g kg^{-1} DM)	320.7	371.1	535.5
Acid detergent fiber (g kg^{-1} DM)	149.6	194.3	378.6
Ether extract (g kg^{-1} DM)	200.5	191.0	18.0

2.3. *In Vitro* Fermentation

2.3.1. Collection of Inoculum and Preparation of the Nutrient Medium

The inoculum was obtained from four steers (420 ± 20 kg LW) slaughtered in the municipal slaughterhouse of Toluca, State of Mexico, Mexico, and for the collection of the rumen content and the transfer to the laboratory, hermetic thermoses were used. The extraction of the ruminal liquid was carried out by filtering the rumen content with four layers of cheesecloth, which was then mixed and kept at 39 °C until use. The nutrient medium contained buffer solution, macrominerals, microminerals, resazurin and distilled water and was prepared following methodology described by Goering and Van Soest [30]. Before incubation, the ruminal inoculum and the nutrient medium were mixed at a ratio of 1:4 (*v*/*v*) using a magnetic stirrer, with the temperature maintained at 39 °C.

2.3.2. Incubation Process

Prior to incubation, 500 mg of each diet was weighed and placed in a glass flask with a capacity of 160 mL; then, the doses of GAA and 50 mL of the obtained solution of ruminal inoculum and the nutrient medium were added. The bottles were sealed with butyl rubber stoppers and aluminum seals, shaken and incubated in an incubator at 39 °C for the evaluation period, which, in this case, corresponded to 48 h. Each treatment was incubated in triplicate, and three flasks without substrate were added as blanks to correct for gas measurements.

2.3.3. Measurement of Gas Production

The volume of the total gas production (GP) was measured after 2, 4, 12, 24, 27, 30 and 48 h of incubation, following the technique proposed by Theodorou et al. [31] using a digital manometer (Manometer model 407910, Extech® Instruments, Nashue, NH, USA). Methane (CH_4), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H_2S) were quantified at the same time points as the total gas but with a portable gas detector (Dräger X-am®, model 2500, Dräger, Lübeck, SH, Germany) equipped with an external pump (Dräger X-am®, Dräger, Lübeck, SH, Germany) in which a known amount of gas was injected, simultaneously indicating the percentage of each gas [32]. At the end of each measurement, the gas accumulated in the headspace of the vials was released to avoid partial dissolution of the gases and erroneous estimates [33].

2.3.4. pH and Dry Matter Degradation

At the end of the incubation, the contents of the vials were filtered following the methodology described by Alvarado-Ramírez et al. [34], which consisted of retaining the residual substrate in bags with 25 µm porosity (Filter bags F57, ANKOM Technology Corp, Macedon, NY, USA) and collecting the liquid in beakers. The pH of the liquids was measured using a potentiometer with a glass electrode (pH wireless electrode HALO® model HI11102, Hanna® Instruments, Woonsocket, RI, USA), while the residual substrate was washed with plenty of water and dehydrated at 60 °C for 48 h to calculate the dry matter degradation by weight difference.

2.3.5. Calculations

The kinetics of production of GP, CH_4, CO and H_2S were estimated by adjusting the volume of the gases with the NLIN procedure of SAS [35] according to the model proposed by France et al. [36]:

$$y = b \times [1 - e^{-c(t-Lag)}] \quad (1)$$

where:

y = volume (mL) of GP, CH_4, CO and H_2S at time t (h);
b = asymptotic GP, CH_4, CO and H_2S production (mL g^{-1} DM);
c = the rate GP, CH_4, CO and H_2S production (mL h^{-1});
Lag = the initial delay time before the beginning of GP, CH_4, CO and H_2S production (h).

Metabolizable energy (ME; MJ kg^{-1} DM) was estimated according to the equation proposed by Menke et al. [37]:

$$ME = 2.20 + (0.136 \times GP) + (0.057 \times CP) \quad (2)$$

where:

GP = total gas production (mL 200 mg^{-1} DM) after 24 h of incubation;
CP = crude protein (g kg^{-1} DM).

Short-chain fatty acid (SCFA; mmol 200 mg^{-1} DM) concentrations were calculated according to Getachew et al. [38]:

$$SCFA = (0.0222 \times GP) - 0.00425 \quad (3)$$

where GP = total gas production (mL 200 mg^{-1} DM) after 24 h of incubation.

Additionally, the ratios of CH_4 to SCFA (CH4:SCFA; mmol $mmol^{-1}$), ME (CH4:ME; g MJ^{-1}) and OM (CH4:OM; mL g^{-1}) were calculated.

2.4. *Statistical Analysis*

The experimental design was completely randomized with a 3 × 7 bifactorial arrangement; a factor A corresponded to the percentage of AH, and factor B corresponded to the GAA doses, with three repetitions per treatment. The analysis was carried out with the GLM procedure of the SAS program [35] according to the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A \times B)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad (4)$$

where Y_{ijk} is the response variable, μ is the overall mean, A_i is the effect of the percentage of AH, B_j is the effect of the dose of GAA, $(A \times B)_{ij}$ is the effect of the interaction between the percentage of AH and the dose of GAA and ε_{ijk} is the experimental error. Linear and quadratic polynomial contrasts were used to evaluate the response of the different percentages of AH with increasing doses of GAA in the diet. Tukey's test was applied for comparison of means, with significant differences considered when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. In Vitro Ruminal Total Gas (GP) Production

Figure 1 shows the effect of the different percentages of alfalfa hay (AH) and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet on the in vitro rumen production kinetics of GP. With increased AH contents from 10 (AH10) to 25% (AH25) in the diet, the asymptotic production (mL g^{-1} DM) and the production rate (mL GP h^{-1}) of GP increased ($p < 0.0001$), whereas when AH contents were increased from 25 to 100% (AH100) asymptotic production and the GP production rate decreased, and the time (h) in the delay phase presented an opposite effect ($p = 0.0094$). At 4 and 24 h, GP production (mL GP g^{-1} DM incubated and degraded) decreased ($p < 0.0001$) with augmentation of AH content, while at 48 h, it increased ($p < 0.0001$) with augmentation of AH content from 10 to 25%, then decreased when AH content was increased from 25 to 100% (Figure 1A; Table 2). GAA doses did not affect ($p = 0.8443$) asymptotic production but decreased ($p = 0.0343$) the rate of GP production and increased ($p = 0.0255$) the time in the lag phase. At 24 h, the production of GP (mL GP g^{-1} DM incubated and degraded) increased ($p < 0.0001$) with the addition of GAA, except with doses of 0.0005 and 0.0010 g, with which GP production decreased (Figure 1B; Table 2). However, with respect to the interaction ($p = 0.0330$) between the percentage of AH and the GAA dose, it was observed that GAA only affected the parameters of GP production in the AH100 diet, and although the GAA doses did not show a trend, all or most decreased ($p = 0.0135$) asymptotic production and the total gas production rate and increased ($p = 0.0081$) the time in the lag phase. In addition, it was observed that with respect to the production of GP, there was interaction ($p = 0.0010$) at 24 and 48 h but only ($p = 0.0405$) in the AH10 diet, while in the AH25 diet, there was no interaction ($p = 0.2780$), and in the AH100 diet, an interaction was only observed ($p = 0.0013$) at 48 h. In the AH10 diet, GP production (mL GP g^{-1} DM incubated and degraded) increased with increasing GAA dose both at 24 and 48 h, except with the 0.0005 g dose, while in the AH10 diet, AH100 decreased with increasing dose (Table 2).

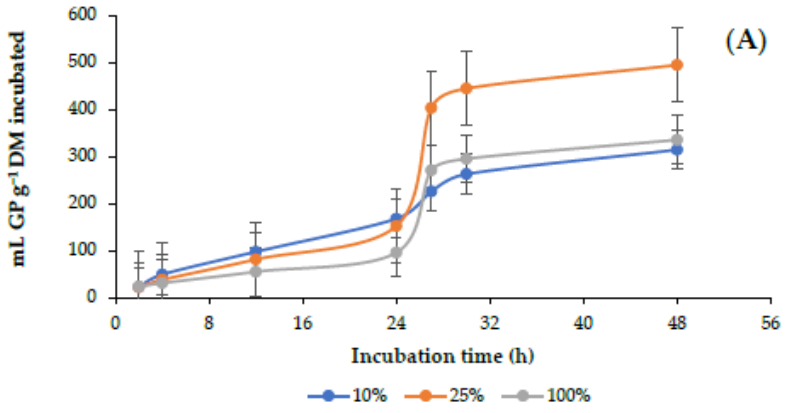


Figure 1. *Cont.*

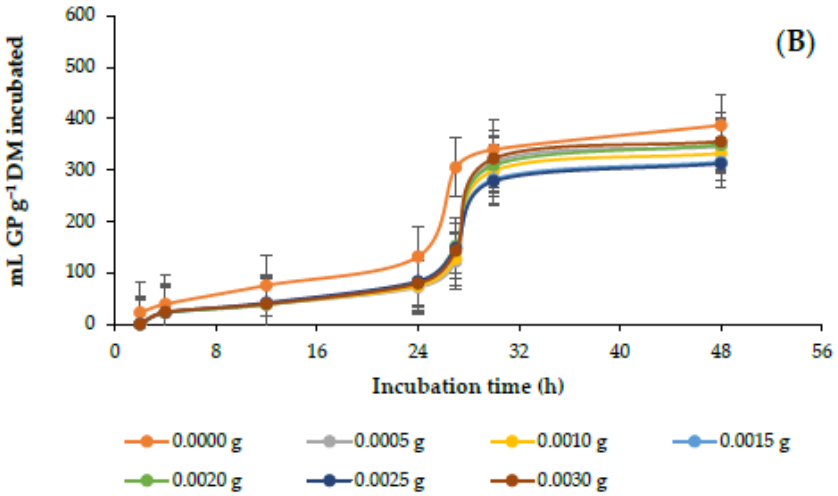


Figure 1. Kinetics of in vitro ruminal production of total gas production (GP) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay (**A**) and doses (g g^{-1} DM diet) of guanidinoacetic acid (**B**).

Table 2. Parameters and in vitro ruminal total gas production (GP) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet after 4, 24 and 48 h of incubation.

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	Gas Production (GP)								
		Parameters [1]			mL GP g^{-1} DM Incubated			mL GP g^{-1} DM Degraded		
		b	*c*	*Lag*	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
10	0.0000	302.73	0.0240	1.73	50.58	144.61	248.84	101.16	289.22	497.68
	0.0005	306.07	0.0214	3.08	50.30	121.33	241.49	100.59	242.66	482.97
	0.0010	328.60	0.0244	3.88	46.76	138.26	266.60	93.52	276.53	533.19
	0.0015	319.92	0.0306	2.98	47.86	184.90	297.99	95.71	369.82	595.99
	0.0020	388.68	0.0322	5.01	47.86	201.41	359.60	95.71	402.81	719.20
	0.0025	339.43	0.0308	3.26	50.26	191.57	316.38	100.52	383.14	632.76
	0.0030	356.75	0.1772	4.70	49.23	192.15	469.53	98.46	384.29	939.06
	SEM [2]	32.192	0.05572	0.796	2.000	9.852	45.802	4.000	19.704	91.605
	Dose of GAA	0.5292	0.4410	0.1387	0.7553	0.0002	0.0405	0.7554	0.0002	0.0405
	Linear	0.7115	0.9341	0.2855	0.3526	0.0118	0.4606	0.3520	0.0118	0.4605
	Quadratic	0.6680	0.9673	0.1408	0.3329	0.0455	0.9049	0.3333	0.0455	0.9049
25	0.0000	415.83	0.2988	2.88	35.75	151.94	494.32	71.50	303.87	988.63
	0.0005	505.82	0.3512	3.11	34.55	146.88	523.29	69.10	293.75	1046.58
	0.0010	522.18	0.2612	2.53	39.14	151.61	521.63	78.28	303.21	1043.27
	0.0015	478.85	0.2408	5.01	40.02	155.97	477.39	80.04	311.93	954.78
	0.0020	427.05	0.1790	4.65	37.34	154.91	422.23	74.68	309.81	844.46
	0.0025	508.32	0.2092	2.70	42.49	158.41	510.65	84.98	316.82	1021.30
	0.0030	492.48	0.2865	2.94	34.97	144.03	513.29	69.94	288.05	1026.59
	SEM [2]	41.481	0.07482	1.123	2.471	4.789	47.545	4.942	9.581	95.090
	Dose of GAA	0.4634	0.7287	0.5955	0.2780	0.3957	0.7498	0.2777	0.3959	0.7498
	Linear	0.3009	0.5922	0.2020	0.2422	0.5613	0.8049	0.2420	0.5616	0.8049
	Quadratic	0.1628	0.9266	0.3217	0.6850	0.6954	0.5488	0.6852	0.6955	0.5488

Table 2. *Cont.*

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	Gas Production (GP)								
		Parameters [1]			mL GP g^{-1} DM Incubated			mL GP g^{-1} DM Degraded		
		b	*c*	*Lag*	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
100	0.0000	399.65	0.3490	3.32	30.46	97.38	418.27	60.91	194.76	836.54
	0.0005	363.45	0.3536	3.32	28.37	91.70	381.39	56.74	183.41	762.77
	0.0010	333.15	0.3217	3.15	30.60	92.37	349.09	61.19	184.75	698.19
	0.0015	320.30	0.1150	7.20	31.44	100.32	306.87	62.89	200.65	613.74
	0.0020	390.33	0.3589	3.30	28.97	99.63	407.14	57.94	199.26	814.27
	0.0025	286.58	0.0334	8.08	32.15	94.44	256.72	64.30	188.88	513.43
	0.0030	255.53	0.0312	6.06	33.48	92.40	228.47	66.95	184.79	456.94
	SEM [2]	26.128	0.03710	0.986	1.162	3.008	27.847	2.324	6.015	55.693
	Dose of GAA	0.0135	<0.0001	0.0081	0.0913	0.2643	0.0013	0.0913	0.2641	0.0013
	Linear	0.0498	0.0005	0.0145	0.5590	0.5008	0.0134	0.5571	0.5005	0.0134
	Quadratic	0.4160	0.0684	0.1028	0.8083	0.1004	0.6987	0.8053	0.1004	0.6987
Pooled SEM [2]		33.861	0.05796	0.977	1.954	6.559	41.367	3.908	13.118	82.735
p-value										
Alfalfa hay		<0.0001	<0.0001	0.0094	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Linear		<0.0001	<0.0001	0.8244	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Quadratic		<0.0001	0.0145	0.0024	<0.0001	<0.0001	0.0008	<0.0001	<0.0001	0.0008
Dose of GAA		0.8443	0.0343	0.0255	0.2804	<0.0001	0.8297	0.2800	<0.0001	0.8297
Linear		0.9919	0.0509	0.0041	0.5999	0.0053	0.4390	0.5994	0.0053	0.4390
Quadratic		0.3685	0.5279	0.3407	0.7094	0.0149	0.8608	0.7086	0.0149	0.8608
Alfalfa hay × dose of GAA		0.0330	0.0019	0.0299	0.3258	<0.0001	0.0010	0.3258	<0.0001	0.0010

[1] *b* is the asymptotic total gas production (mL GP g^{-1} DM); *c* is the rate of gas production (mL GP h^{-1}); *Lag* is the initial delay before gas production begins (h). [2] SEM, standard error of the mean.

3.2. In Vitro Ruminal Methane (CH_4) Production

Figure 2 shows the effect of the different percentages of AH and the dose of GAA in the diet on the kinetics of in vitro rumen production of CH_4. The asymptotic production (mL CH_4 g^{-1} DM) and the production rate (mL CH_4 h^{-1}) of CH_4 increased ($p = 0.0038$) when AH contents in the diet were increased from 10 to 25%, while with an increase in AH contents from 25 to 100%, they decreased. At 4 and 24 h, CH_4 production decreased ($p \leq 0.0001$) as the AH percentage increased, while at 48 h CH_4 production first increased, then decreased ($p < 0.0001$). However, in the case of the CH_4 proportion (mL CH_4 100 mL^{-1} GP), there was no significant decrease at 24 h (Figure 2A; Table 3). In contrast, GAA did not affect ($p = 0.2799$) the parameters of CH_4 production, and after 4 h of incubation, all doses of GAA increased ($p = 0.0349$) the production and proportion of CH_4 (mL CH_4 100 mL^{-1} GP), except for 0.0005 and 0.0010 g, for which the production and proportion of CH_4 decreased (Figure 2B; Table 3). However, the interaction between the percentage of AH and the dose of GAA had an effect ($p = 0.0438$) on the asymptotic production of CH_4 and the production of CH_4 throughout incubation. In the AH10 diet, asymptotic production increased ($p = 0.0103$) with the addition of GAA, with no influence in the AH25 diet group ($p = 0.0965$), and in AH100 it decreased ($p = 0.0113$). In addition, GAA increased ($p = 0.0439$) the production of CH_4 at 4 and 48 h in the AH10 diet, with no effect in the AH25 diet group, ($p = 0.1244$) and in the AH100 diet group, it only decreased CH_4 production ($p = 0.0113$) at 48 h. However, GAA increased ($p = 0.0041$) the proportion of CH_4 at 4 h in the AH10 diet and decreased CH_4 production at 48 h in the AH25 diet ($p = 0.0042$), with no influence in the AH100 diet group ($p = 0.1050$; Table 3).

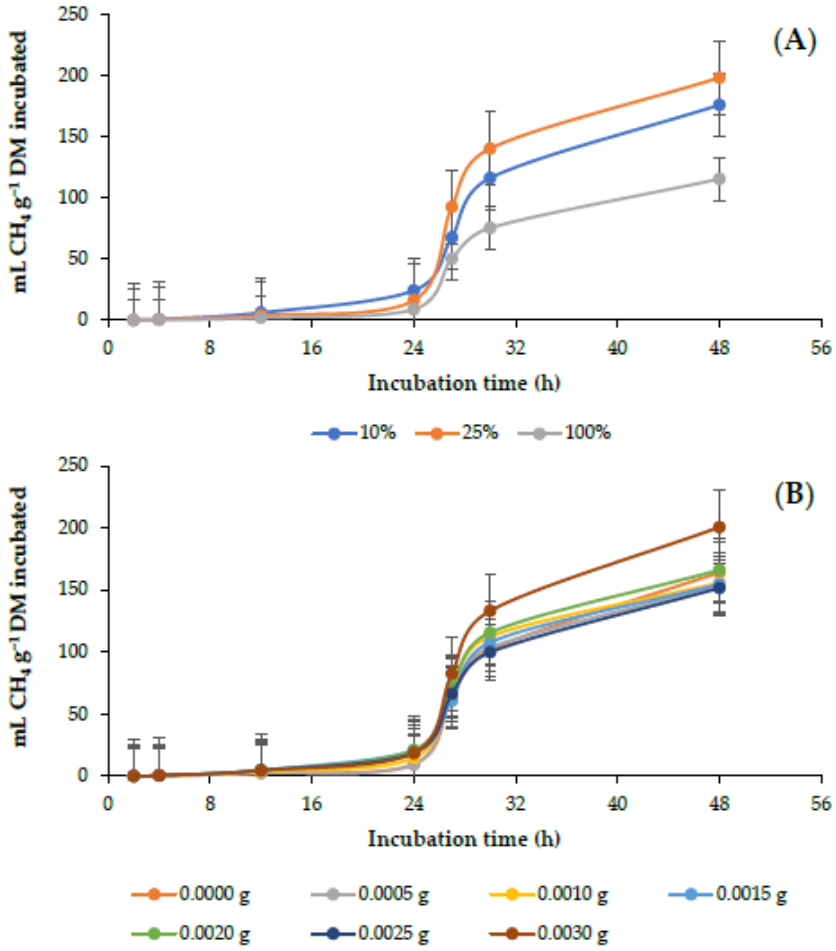


Figure 2. Kinetics of in vitro ruminal production of methane (CH_4) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay (**A**) and doses (g g^{-1} DM diet) of guanidinoacetic acid (**B**).

Table 3. Parameters and in vitro ruminal production of methane (CH_4) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet after 4, 24 and 48 h of incubation.

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	CH_4 Production								
		Parameters [1]			mL CH_4 g^{-1} DM Incubated			mL CH_4 100 mL^{-1} GP		
		b	*c*	*Lag*	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
10	0.0000	87.13	0.1367	13.68	0.59	7.02	87.44	1.17	4.88	34.96
	0.0005	90.83	0.1683	13.75	0.30	7.64	91.47	0.58	6.25	36.50
	0.0010	137.87	0.1779	13.94	0.57	18.83	87.67	1.25	12.63	32.87
	0.0015	207.47	0.1423	13.08	0.80	42.98	123.30	1.67	23.25	41.75
	0.0020	225.53	0.1521	13.26	0.76	41.28	142.30	1.58	20.63	39.96
	0.0025	200.07	0.1526	13.94	1.00	25.32	116.66	2.00	13.38	37.31
	0.0030	277.02	0.1803	14.18	1.03	25.89	148.10	2.08	13.38	33.17
	SEM [2]	34.070	0.015	0.398	0.111	9.753	14.925	0.223	5.084	4.457
	Dose of GAA	0.0103	0.3381	0.4760	0.0044	0.1072	0.0439	0.0041	0.1787	0.7559

Table 3. *Cont.*

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	CH_4 Production								
		Parameters [1]			mL CH_4 g^{-1} DM Incubated			mL CH_4 100 mL^{-1} GP		
		b	*c*	*Lag*	4 h	24 h	48 h	4 h	24 h	48 h
	Linear	0.0256	0.7984	0.3020	0.2169	0.0207	0.1114	0.1347	0.0228	0.2998
	Quadratic	0.8244	0.0594	0.2686	0.3742	0.6137	0.3494	0.5510	0.8211	0.3325
25	0.0000	233.50	0.1810	14.22	0.42	13.45	234.83	1.17	8.88	47.88
	0.0005	193.18	0.2056	13.66	0.49	12.45	199.23	1.42	8.63	37.38
	0.0010	189.73	0.2325	13.79	0.44	15.27	196.60	1.17	10.00	37.42
	0.0015	174.10	0.1948	13.69	0.47	14.82	176.88	1.17	9.50	36.00
	0.0020	141.78	0.1813	13.78	0.30	16.28	142.66	0.83	10.63	33.63
	0.0025	171.00	0.1886	13.48	0.56	17.52	175.32	1.33	11.13	34.29
	0.0030	258.23	0.1619	13.67	0.46	22.03	260.50	1.25	15.25	50.75
	SEM [2]	26.195	0.023	0.196	0.077	2.199	27.708	0.197	1.495	2.920
	Dose of GAA	0.0965	0.5113	0.2920	0.4419	0.1244	0.1311	0.5338	0.0978	0.0042
	Linear	0.1311	0.6808	0.0734	0.6552	0.6663	0.1613	1.0000	0.7713	0.0122
	Quadratic	0.6677	0.1406	0.5118	0.9862	0.6807	0.7892	1.0000	0.6637	0.2269
100	0.0000	168.55	0.1719	14.12	0.10	8.04	170.28	0.33	8.25	40.42
	0.0005	149.45	0.1632	13.42	0.00	12.68	151.87	0.00	13.75	39.59
	0.0010	132.25	0.1670	13.90	0.00	9.78	133.43	0.00	10.38	37.79
	0.0015	80.45	0.1921	14.46	0.08	4.54	80.64	0.25	4.50	26.00
	0.0020	128.27	0.1965	14.01	0.09	5.48	130.24	0.33	5.50	31.84
	0.0025	79.03	0.1317	12.98	0.06	13.04	79.65	0.17	13.75	30.25
	0.0030	60.26	0.1833	13.93	0.00	7.89	60.32	0.00	8.63	26.21
	SEM [2]	19.639	0.013	0.279	0.045	3.084	20.029	0.144	3.158	4.129
	Dose of GAA	0.0113	0.0465	0.0406	0.4309	0.3938	0.0113	0.3809	0.3066	0.1050
	Linear	0.0068	0.2833	0.4030	0.7221	0.4353	0.0069	0.6893	0.4152	0.0270
	Quadratic	0.7521	0.3547	0.2765	0.1219	0.3705	0.7500	0.1212	0.3188	0.3803
Pooled SEM [2]		27.280	0.018	0.303	0.083	6.041	21.538	0.191	3.562	3.892
p-value										
Alfalfa hay		<0.0001	0.0038	0.6843	<0.0001	0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0872	0.0128
Linear		0.1911	0.0009	0.6823	<0.0001	0.0153	<0.0001	0.0076	0.1338	0.1601
Quadratic		<0.0001	0.6998	0.4446	<0.0001	0.0002	0.0002	<0.0001	0.0995	0.0085
Dose of GAA		0.2799	0.3149	0.3284	0.0027	0.1238	0.2359	0.0349	0.4695	0.3473
Linear		0.6864	0.3658	0.2865	0.2617	0.0274	0.0401	0.3775	0.0877	0.0471
Quadratic		0.7868	0.0772	0.9835	0.2192	0.9049	0.6801	0.2637	0.6572	0.5152
Alfalfa hay × dose of GAA		<0.0001	0.1989	0.0748	0.0012	0.0274	0.0011	0.0021	0.0438	0.0121

[1] *b* is the asymptotic CH_4 production (mL CH_4 g^{-1} DM); *c* is the rate of CH_4 production (mL CH_4 h^{-1}); *Lag* is the initial delay before CH_4 production begins (h). [2] SEM, standard error of the mean.

3.3. In Vitro Ruminal Carbon Monoxide (CO) Production

Figure 3 shows the effect of the different percentages of AH and the doses of GAA in the diet on the kinetics of in vitro rumen production of CO. The asymptotic production (mL CO g^{-1} DM) and the production rate (mL CO h^{-1}) of CO indicate an effect ($p = 0.0005$) of the percentage of AH, as both increased when the percentage of AH was increased from 10 to 25%, while when AH content was increased from 25 to 100%, they both decreased. At 4 h, CO production decreased ($p < 0.0001$) as the percentage of AH increased, while at 24 and 48 h, CO production first increased ($p < 0.0001$), then decreased (Figure 1A; Table 4). Instead, the doses of GAA did not influence ($p = 0.4968$) the production parameters but did influence the production of CO after 24 h of incubation, at which point an increase in the dose of GAA increased ($p = 0.0084$) the production of CO, except with doses of 0.0005 and 0.0010 g, for which CO production decreased (Figure 3B; Table 4). However, an interaction ($p = 0.0413$) was observed between the percentage of AH and the dose of GAA for the rate and production of CO throughout the incubation period. With an increase in the dose of GAA, the rate of CO production increased ($p = 0.0086$) in the AH10 diet, except with

doses of 0.0005 and 0.0010 g, while in the AH25 and AH100 diets, no effect was observed ($p = 0.4457$). Furthermore, with most GAA doses, CO production increased ($p = 0.0397$) at 4 h in the AH10 diet and at 24 h in the AH25 diet, while in the AH100 diet, CO production only decreased ($p = 0.0227$) at 48 h (Table 4).

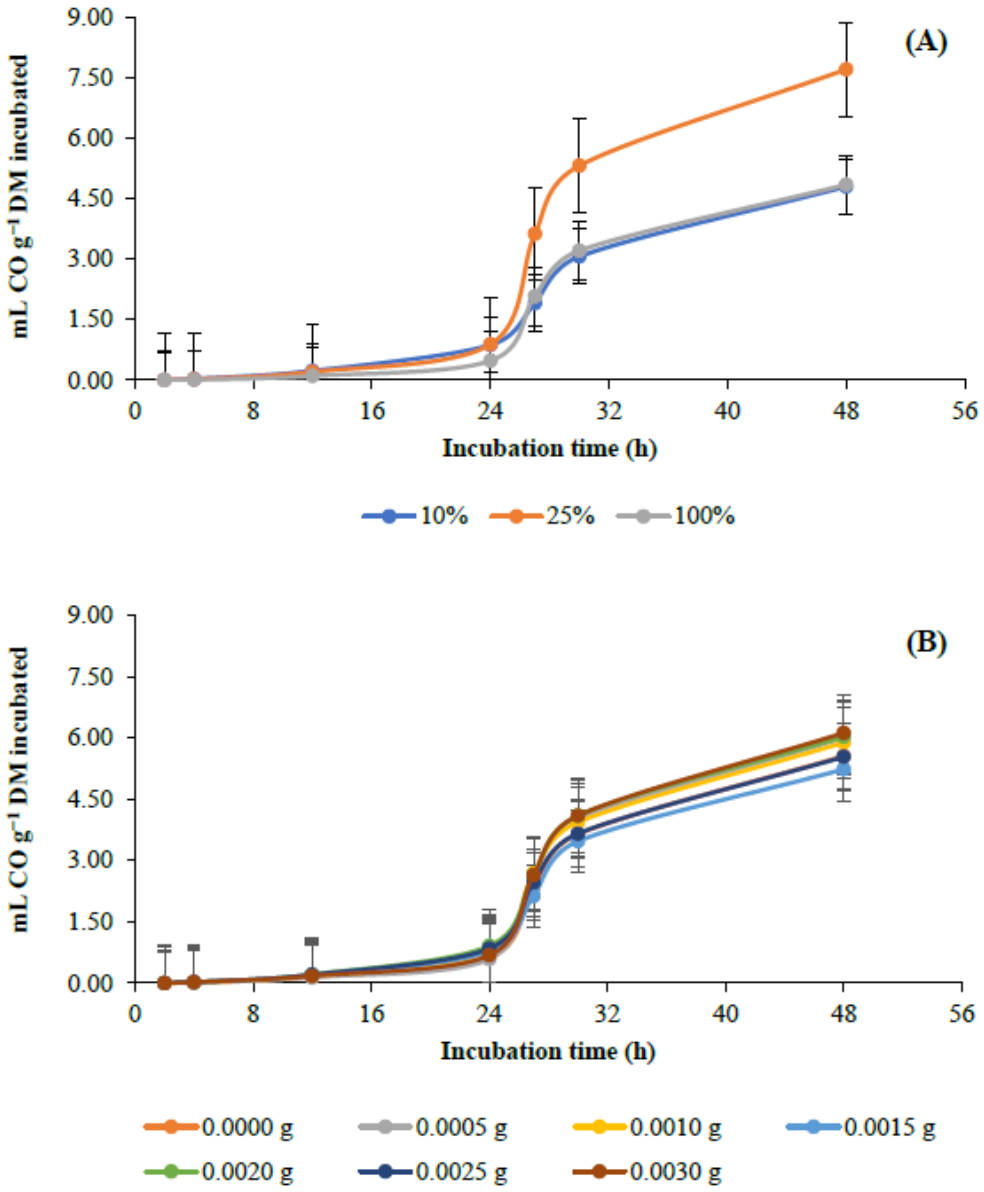


Figure 3. Kinetics of in vitro ruminal production of carbon monoxide (CO) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay (**A**) and doses (g g^{-1} DM diet) of guanidinoacetic acid (**B**).

Table 4. Parameters and in vitro ruminal production of carbon monoxide (CO) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet after 4, 24 and 48 h of fermentation.

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	CO Production					
		Parameters [1]			mL CO g^{-1} DM Incubated		
		b	*c*	*Lag*	4 h	24 h	48 h
10	0.0000	3.0867	0.0614	5.14	0.0294	0.6530	3.2352
	0.0005	2.3867	0.0053	6.40	0.0132	0.4976	3.5657
	0.0010	4.4267	0.0419	5.78	0.0212	0.7865	4.2513
	0.0015	5.2767	0.0740	4.42	0.0333	0.9961	4.5540
	0.0020	5.4600	0.1362	2.63	0.0349	1.0831	5.4524
	0.0025	4.5767	0.1192	2.71	0.0415	0.9328	4.5694
	0.0030	4.5400	0.1531	3.27	0.0437	1.1410	7.9702
	SEM [2]	0.68045	0.02497	1.316	0.00557	0.16812	0.96506
	Dose of GAA	0.0574	0.0086	0.3129	0.0186	0.1414	0.0617
	Linear	0.0391	0.7259	0.7035	0.6255	0.1709	0.3503
	Quadratic	0.7731	0.4133	0.5444	0.1585	0.8559	0.7673
25	0.0000	7.7433	0.1620	3.40	0.0190	0.8815	7.8135
	0.0005	8.6800	0.1744	3.44	0.0223	0.9532	8.8230
	0.0010	8.2267	0.1695	3.28	0.0218	0.9709	8.3586
	0.0015	7.1367	0.1606	3.54	0.0224	0.8366	7.1847
	0.0020	6.1867	0.1432	2.92	0.0240	1.0288	6.2225
	0.0025	8.2133	0.1648	3.39	0.0221	1.0196	8.2938
	0.0030	7.5400	0.1196	5.16	0.0213	0.5214	7.2556
	SEM [2]	1.01042	0.02428	0.534	0.00301	0.10047	1.09523
	Dose of GAA	0.6725	0.7221	0.1691	0.9517	0.0397	0.6872
	Linear	0.6776	0.9681	0.8557	0.4421	0.7567	0.6909
	Quadratic	0.5352	0.7884	0.7835	0.7596	0.3790	0.5320
100	0.0000	5.8233	0.1175	4.96	0.0061	0.3159	5.6202
	0.0005	5.8967	0.1698	3.52	0.0049	0.5169	5.9736
	0.0010	6.4300	0.1098	4.75	0.0049	0.4480	5.0598
	0.0015	4.4233	0.1016	4.49	0.0091	0.4945	3.9633
	0.0020	6.3633	0.1697	3.65	0.0079	0.6257	6.4153
	0.0025	4.5633	0.0854	4.48	0.0073	0.5894	3.7541
	0.0030	5.5267	0.0517	5.46	0.0049	0.3702	3.1422
	SEM [2]	0.79748	0.04234	1.275	0.00123	0.09110	0.65469
	Dose of GAA	0.4550	0.4457	0.9291	0.1537	0.2480	0.0227
	Linear	0.2349	0.7936	0.7982	0.1094	0.1874	0.0952
	Quadratic	0.2023	0.9962	0.9891	0.0959	0.7073	0.7431
Pooled SEM [2]		0.84062	0.03165	1.102	0.00372	0.12471	0.92367
p-value							
Alfalfa hay		<0.0001	0.0005	0.2818	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Linear		<0.0001	0.0001	0.2109	<0.0001	0.7950	<0.0001
Quadratic		0.3249	0.7190	0.3237	<0.0001	<0.0001	0.0020
Doses of GAA		0.9153	0.6899	0.4968	0.0084	0.0617	0.8625
Linear		0.9295	0.9516	0.6984	0.2668	0.1260	0.6713
Quadratic		0.1969	0.7968	0.7212	0.1461	0.6620	0.4530
Alfalfa hay × dose of GAA		0.1093	0.0287	0.5601	0.0077	0.0413	0.0109

[1] *b* is the asymptotic CO production (ppm CO g^{-1} DM); *c* is the rate of CO production (ppm CO h^{-1}); *Lag* is the initial delay before CO production begins (h). [2] SEM, standard error of the mean.

3.4. In Vitro Ruminal Hydrogen Sulfide (H_2S) Production

Figure 4 shows the effect of the different percentages of AH and the doses of GAA in the diet on the kinetics of in vitro rumen production of H_2S. The percentage of AH did not affect ($p = 0.0724$) the parameters, but it did ($p = 0.0136$) affect the production of H_2S; when the percentage of AH was increased from 10 to 25%, the production of H_2S decreased

(p = 0.0136), while when AH content was increased from 25 to 100%, H_2S production increased, and the AH100 diet surpassed (p = 0.0136) the AH10 in the production of H_2S after 48 h (Figure 4A; Table 5). Similarly, GAA doses did not influence (p = 0.4699) the parameters but did (p = 0.0034) influence the H_2S production throughout the incubation period. Although no trend was observed, H_2S production decreased (p = 0.0034) with the addition of GAA throughout the incubation period, except with a dose of 0.0030 g at 48 h, for which H_2S production increased (Figure 4B; Table 5). In this case, the interaction between the AH percentage and the GAA dose was significant (p = 0.0032) with respect to H_2S production throughout the incubation period; when the GAA dose was increased, the H_2S production in the diet AH10 decreased (p < 0.0001) throughout incubation, and in the AH100 diet, it increased (p = 0.0141) at 48 h with most doses (Table 5).

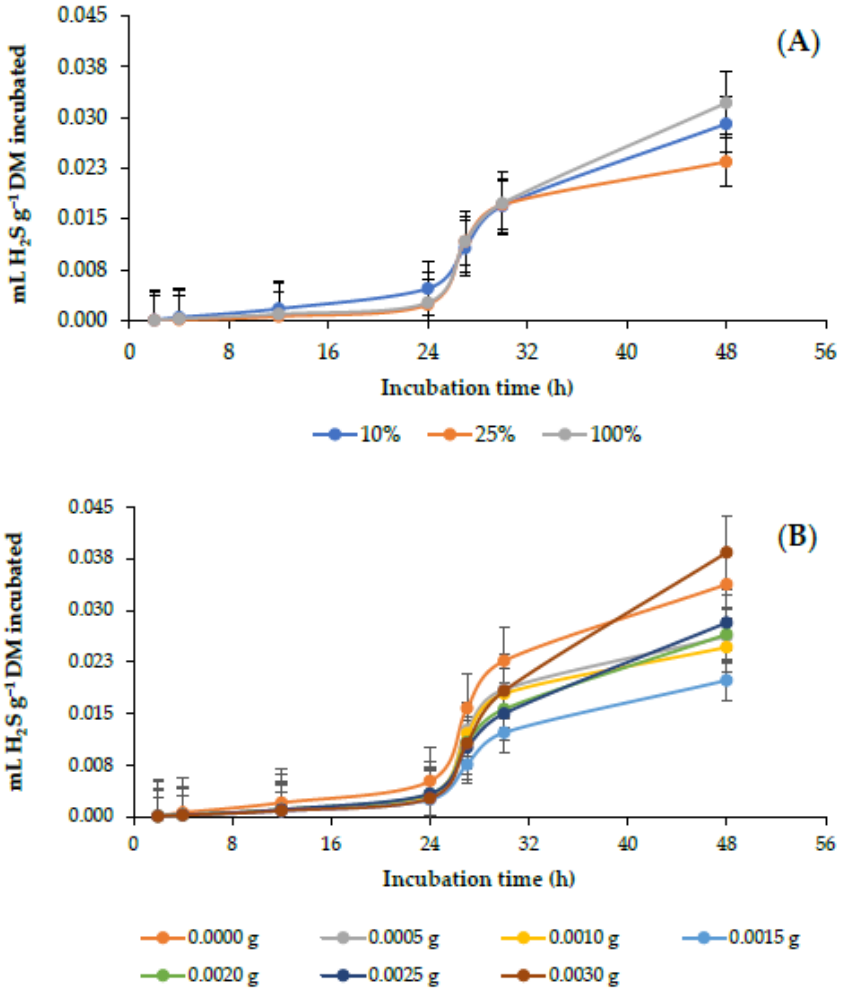


Figure 4. Kinetics of in vitro ruminal production of hydrogen sulfide (H_2S) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay (**A**) and doses (g g^{-1} DM diet) of guanidinoacetic acid (**B**).

Table 5. Parameters and in vitro ruminal production of hydrogen sulfide (H_2S) in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet after 4, 24 and 48 h of incubation.

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	H_2S Production					
		Parameters [1]			mL H_2S g^{-1} DM Incubated		
		b	*c*	*Lag*	4 h	24 h	48 h
10	0.0000	0.1443	0.0001	7.97	0.0016	0.0117	0.0490
	0.0005	0.0186	0.0008	5.73	0.0006	0.0045	0.0278
	0.0010	0.0287	0.0021	6.12	0.0004	0.0049	0.0266
	0.0015	0.1154	0.0347	6.19	0.0002	0.0028	0.0196
	0.0020	0.1349	0.0053	6.68	0.0002	0.0029	0.0260
	0.0025	0.0859	0.0032	5.61	0.0002	0.0031	0.0200
	0.0030	0.3613	0.0006	8.60	0.0003	0.0033	0.0347
	SEM [2]	0.10255	0.01278	1.121	0.00009	0.00102	0.00591
	Dose of GAA	0.3428	0.4881	0.4326	<0.0001	0.0002	0.0441
	Linear	0.8449	0.0761	0.2805	<0.0001	<0.0001	0.0034
	Quadratic	0.4341	0.3445	0.4960	0.0004	0.0744	0.3035
25	0.0000	0.0143	0.0005	6.05	0.0001	0.0022	0.0267
	0.0005	0.0378	0.0002	6.97	0.0001	0.0022	0.0253
	0.0010	0.0218	0.0002	3.97	0.0002	0.0027	0.0260
	0.0015	0.0259	0.0003	6.83	0.0001	0.0022	0.0206
	0.0020	0.0820	0.0003	6.01	0.0002	0.0028	0.0178
	0.0025	0.0191	0.0004	5.06	0.0001	0.0028	0.0243
	0.0030	0.0393	0.0012	4.51	0.0001	0.0018	0.0236
	SEM [2]	0.02106	0.00030	1.428	0.00003	0.00038	0.00278
	Dose of GAA	0.3653	0.2516	0.6931	0.7583	0.4321	0.3162
	Linear	0.7027	0.6440	0.7063	0.4577	1.0000	0.1431
	Quadratic	0.9494	0.5941	0.1788	0.2071	0.2721	0.5134
100	0.0000	0.0155	0.0001	5.98	0.0002	0.0016	0.0255
	0.0005	0.0133	0.0006	6.58	0.0001	0.0017	0.0263
	0.0010	0.0023	0.0003	7.35	0.0001	0.0018	0.0213
	0.0015	0.4484	0.0007	7.51	0.0004	0.0024	0.0193
	0.0020	0.0228	0.0001	7.57	0.0005	0.0041	0.0357
	0.0025	0.1446	0.0022	6.65	0.0004	0.0041	0.0403
	0.0030	0.0403	0.0001	8.99	0.0003	0.0029	0.0568
	SEM [2]	0.17054	0.00061	1.313	0.00009	0.00066	0.00654
	Dose of GAA	0.5217	0.2355	0.7660	0.0536	0.0714	0.0141
	Linear	0.0943	0.5433	0.4238	0.1383	0.4089	0.5116
	Quadratic	0.2902	0.8599	0.7139	0.2463	0.7785	0.8976
Pooled SEM [2]		0.11553	0.00739	1.294	0.00008	0.00073	0.00534
p-value							
Alfalfa hay		0.3172	0.2086	0.0724	<0.0001	<0.0001	0.0136
Linear		0.1408	0.1218	0.1291	<0.0001	<0.0001	0.0560
Quadratic		0.7450	0.3878	0.0811	0.3792	0.0110	0.0217
Doses of GAA		0.4699	0.4671	0.7369	<0.0001	0.0012	0.0034
Linear		0.1495	0.0602	0.8688	<0.0001	<0.0001	0.0026
Quadratic		0.1865	0.3239	0.3077	0.0007	0.1852	0.5690
Alfalfa hay × dose of GAA		0.4531	0.5014	0.6710	<0.0001	<0.0001	0.0032

[1] *b* is the asymptotic H_2S production (ppm H_2S g^{-1} DM); *c* is the rate of H_2S production (ppm H_2S h^{-1}); *Lag* is the initial delay before H_2S production begins (h). [2] SEM, standard error of the mean.

3.5. In Vitro Rumen Fermentation Profile and CH_4 Conversion Efficiency

The percentage of AH influenced ($p = 0.0009$) the ruminal fermentation profile and the efficiency of CH_4 production, except in CH_4 per unit of short-chain fatty acids (SCFA). It was observed that the pH first increased ($p < 0.0001$) with an increase in AH from 10 to 25%; then, when AH was increased from 25 to 100%, the pH decreased. On the other hand,

the degradation of dry matter (DMD), the SCFA, metabolizable energy (ME) and CH_4 per unit of ME and organic matter (OM) presented an opposite effect ($p = 0.0009$). Like the percentage of AH, the dose of GAA influenced ($p = 0.0151$) the rumen fermentation profile and CH_4 per unit of OM, and although no trend was observed when increasing the dose, the addition of GAA decreased ($p = 0.0011$) pH and increased ($p = 0.0151$) DMD, SCFA, ME and the CH_4 per unit of OM unit with most doses. However, the SCFA, the ME and the CH_4 conversion efficiency presented an effect ($p = 0.0438$) on the interaction between the percentage of AH and the dose of GAA. It was observed that only the AH10 diet presented an effect ($p = 0.0002$) of GAA on these variables. In this diet, SCFA and ME increased ($p = 0.0002$) with increasing GAA dose, except with doses of 0.0005 and 0.0010 g, while the amount of CH_4 per OM increased ($p = 0.0002$) with doses of 0.0005, 0.0025 and 0.0030 g and decreased with doses of 0.0010, 0.0015 and 0.0020 g (Table 6).

Table 6. In vitro rumen fermentation profile and CH_4 conversion efficiency in response to different percentages of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hay and doses of guanidinoacetic acid (GAA) in the diet.

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	In Vitro Rumen Fermentation Profile [1]				CH_4 Conversion Efficiency [2]		
		pH	DMD	SCFA	ME	CH_4:SCFA	CH_4:ME	CH_4:OM
10	0.0000	6.98	75.58	6.40	7.20	63.83	9.04	15.16
	0.0005	6.89	78.12	5.36	6.67	81.88	10.61	16.51
	0.0010	6.87	79.77	6.12	7.06	165.30	23.73	14.02
	0.0015	6.83	82.21	8.19	8.13	304.18	49.21	13.53
	0.0020	6.87	84.27	8.92	8.50	269.79	45.29	13.87
	0.0025	6.83	84.22	8.48	8.28	174.98	28.63	24.71
	0.0030	7.03	85.35	8.51	8.29	174.97	28.92	55.95
	SEM [3]	0.055	1.455	0.437	0.225	66.508	10.924	4.750
	Dose of GAA	0.1541	0.0023	0.0002	0.0002	0.1790	0.1343	0.0002
	Linear	0.0747	0.0062	0.0117	0.0116	0.0229	0.0210	0.8118
	Quadratic	0.5789	0.6317	0.0454	0.0454	0.8217	0.6931	0.9562
25	0.0000	7.52	68.43	4.30	6.53	108.19	11.45	17.38
	0.0005	7.50	68.25	4.05	6.40	180.37	18.39	27.40
	0.0010	7.53	60.23	4.08	6.41	136.08	14.08	21.14
	0.0015	7.46	70.51	4.43	6.59	59.00	6.38	9.80
	0.0020	7.45	71.25	4.40	6.58	72.12	7.75	11.84
	0.0025	7.55	69.39	4.17	6.46	180.34	18.74	28.18
	0.0030	7.64	65.48	4.08	6.42	113.14	11.47	17.04
	SEM [3]	0.014	1.582	0.214	0.109	19.580	2.799	4.750
	Dose of GAA	0.0621	0.2894	0.4031	0.4082	0.0978	0.1108	0.1239
	Linear	0.3398	0.6346	0.5681	0.5699	0.7723	0.7147	0.6655
	Quadratic	0.7094	0.5987	0.6943	0.7055	0.664	0.6708	0.6796
100	0.0000	7.21	81.52	6.73	7.37	116.18	16.99	29.07
	0.0005	7.22	80.57	6.50	7.26	112.92	16.07	26.91
	0.0010	7.22	79.93	6.71	7.37	130.91	19.21	33.00
	0.0015	7.23	80.43	6.90	7.46	124.35	18.46	32.03
	0.0020	7.22	85.23	6.86	7.44	139.08	20.45	35.19
	0.0025	7.26	80.03	7.01	7.52	145.62	21.72	37.85
	0.0030	7.27	80.56	6.37	7.19	199.67	28.42	47.62
	SEM [3]	0.031	3.214	0.133	0.068	41.413	4.387	6.663
	Dose of GAA	0.0142	0.2924	0.2615	0.2633	0.3059	0.3629	0.3933
	Linear	0.1960	0.6547	0.5010	0.5235	0.4151	0.4278	0.4350
	Quadratic	0.3136	0.0340	0.0987	0.0986	0.3183	0.3523	0.3703
Pooled SEM [3]		0.037	7.232	0.291	0.149	46.625	6.986	5.462

Table 6. *Cont.*

Alfalfa Hay (%)	Dose of GAA (g g^{-1} Diet)	In Vitro Rumen Fermentation Profile [1]				CH_4 Conversion Efficiency [2]		
		pH	DMD	SCFA	ME	CH_4:SCFA	CH_4:ME	CH_4:OM
p-value								
Alfalfa hay		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0892	0.0009	<0.0001
Linear		<0.0001	0.8821	<0.0001	<0.0001	0.1345	0.0447	<0.0001
Quadratic		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.1020	0.0010	0.0007
Dose of GAA		0.0011	0.0151	<0.0001	<0.0001	0.4709	0.2184	0.0002
Linear		0.0447	0.1709	0.0053	0.0054	0.0882	0.0384	0.6436
Quadratic		0.9170	0.0533	0.0149	0.0151	0.6557	0.9323	0.4082
Alfalfa hay × dose of GAA		0.2397	0.1320	<0.0001	<0.0001	0.0438	0.0359	0.0086

[1] pH is ruminal pH; DMD is dry matter degradability (%); SCFA is short-chain fatty acids (mmol g^{-1} DM) after 24 h of incubation; ME is the metabolizable energy (MJ kg^{-1} DM) after 24 h of incubation; [2] CH_4:SCFA is the methane:short-chain fatty acid ratio (mmol mmol^{-1}) after 24 h of incubation; CH_4:ME is the methane:metabolizable energy ratio (g MJ^{-1}) after 24 h of incubation; CH_4:OM is the methane:organic matter ratio (mL g^{-1}). [3] SEM, standard error of the mean.

4. Discussion

4.1. In Vitro Ruminal Total Gas Production

The total gas production (GP) during fermentation is positively correlated with the degradability of feed nutrients [39], and the degree of degradability is determined by the accessibility of feed components for rumen microorganisms, the activity of rumen microbes and the time available for fermentation [40]. That is why the total gas production and the rate of gas production are used as indicators to assess the degradability of feed and the functionality and adaptability of rumen microbes to the diet [41]. In this study, after 24 h of fermentation, the total gas production was higher in the diets with 10 (AH10) and 25% (AH25) alfalfa hay (AH) compared to the diet containing 100% hay (AH100), while after 48 h, the AH10 and AH100 diet presented similar levels of gas production, which were lower than the total gas obtained with the AH25 diet. This can be attributed to the content of easily fermentable carbohydrates in each diet, as they provide energy to the ruminal microbiota for their metabolic activities during the first hours of fermentation [42], as was observed after 24 h in the AH10 and AH25 diets, which presented a high total gas production. In contrast, the AH100 diet showed fewer fast-fermenting carbohydrates and higher total gas production up to 48 h, indicating that rumen microbes took time to adapt to the diet and had less energy available for their offspring activities compared to the other diets [43].

However, it has been reported that the addition of GAA in the diet can decrease the asymptotic production and the production rate of GP [44], which was observed in the AH100 diet when increasing the dose of GAA, which is attributed to the proportion of short-chain fatty acids (SCFA), since GAA favors the formation of propionate [45], an SCFA that produces less gas compared to acetate and butyrate [46]. In addition, the *lag* phase also increased in this diet; although it did not show a trend with an increasing dose of GAA, this increase can be attributed to the time that ruminal microorganisms require to adapt to the presence of GAA, since it is susceptible to degradability when it is not rumen protected [47], and microorganisms can use it as a source of energy and nitrogen to synthesize their proteins [45]. However, with an increase in GAA, GP production increased in the AH10 diet, while in the AH100 diet, GP production decreased with increased GAA dose. In the case of the AH10 diet, this result can be attributed to the fact that GAA increases the activity of fibrolytic enzymes, α-amylase and protease [45], as well as the populations of total bacteria, fungi, *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminobacter amilophilus* and *Prevotella ruminicola* [26,48], which favors the degradation of the diet, resulting in a consequent increase in GP. In contrast, in the AH100 diet, GAA possibly did not favor enzymatic activity and an increase in the populations of fibrolytic bacteria since GAA did not influence dry matter degradation (DMD) in this diet. In addition, as previously mentioned, it is possible that increasing the dose of GAA favored

the formation of propionate, which leads to a lower production of GP, as supported by the lower proportion of methane.

4.2. In Vitro Ruminal Methane (CH_4) Production

The production of CH_4 in the AH25 diet can be attributed to the higher total gas production that it presented, since feeds that present high total gas production generally also show a higher production of gas CH_4 [41] because in the rumen, the main biochemical process carried out by bacteria, protozoa and fungi is the fermentation of carbohydrates, and as a byproduct, they release short-chain fatty acids (SCFA; mainly acetic, butyric and propionic acids), metabolic hydrogen (H_2) and carbon dioxide (CO_2) [49]. Subsequently, methanogenic archaea remove H_2 by reducing CO_2 to CH_4 [42,50] to maintain low H_2 concentrations in the rumen [51], since, otherwise, inhibition of microbial growth and feed degradation would occur [52]. This metabolic process is known as methanogenesis [53] and is influenced by the fiber content in the food, since fibrous feeds tend to produce more H_2 and therefore more CH_4 [2]. Despite the influence of fiber, the AH100 diet did not produce the most CH_4, which is attributed to the bioactive compounds that this plant presents, since they have antimicrobial and protozoan properties that reduce CH_4 production [54]. In addition, it is important to note that the inclusion of GAA in the AH25 and AH100 diets decreased the production and proportion of CH_4 with most of the doses, which is attributed to the decrease exerted by GAA on the population of the protozoa and methanogens [26,48] and because propionate production increases, which decreases the acetate:propionate ratio and the metabolic H_2 available for the formation of CH_4 [23,26]. However, in the AH10 diet, the results were inconsistent because the inclusion of GAA increased CH_4 production but did not affect the proportion of CH_4 with respect to total gas production. On the other hand, the ruminal population of sulfo-reducing bacteria (SRB) was low but had the ability to compete with methanogens for H_2 for the production of H_2S [55], although it is likely that the inclusion of GAA in the diet caused an inhibitory effect on these bacteria, and therefore, this metabolic pathway did not function as an alternate H_2 sink. In addition, the availability of sulfur (S) is necessary to increase the relative abundance of SRBs and their ability to compete with methanogens for H_2 [56].

4.3. In Vitro Ruminal Carbon Monoxide Production

Carbon monoxide (CO) is a metabolic intermediate gas that, under anaerobic conditions, is produced by anaerobic microbes during the degradation of organic matter (MO) [57]. In the rumen, which is also an anaerobic environment, in addition to the amount of degraded OM, other factors influence the production of CO, including microbial activity and the fermentative capacity of the ruminal microbiota, as well as the type of degraded chemical components (fiber, protein, lipids, etc.) [34]. In addition, some CO dehydrogenase enzymes are highly dependent on the availability of trace minerals, are capable of reducing CO_2 and oxidizing CO by utilizing their catalytic groups for electron transfer and can maintain redox homeostasis during digestion of the feed [58]. Therefore, the variations in the production of CO are attributed to the degraded components of each diet, since although they were similar in protein content, they differed in terms of the other chemical and mineral components (Table 1). In turn, the variations in the chemical composition influence the populations of rumen microorganisms, such as methanogens, acetogens and SRB, which require CO for their metabolism [59]. Therefore, the high production of CO in the AH25 and AH100 diets is attributed to a greater availability of substrates for these microorganisms, and the production of CO increased even more with the dose of GAA, as it results in partial degradation in the rumen and is used by some microorganisms as a substrate for their metabolic functions [60]. In addition, it was observed that the production of CO was positively related to the production of CH_4 of each diet, which may indicate that methanogens maintain a synergy with other microorganisms that produce CO, since in the presence of water, acetogens and methanogens oxidize CO to form CO_2 and H_2 and subsequently produce CH_4 [61,62].

4.4. In Vitro Ruminal Hydrogen Sulfide (H_2S) Production

It has been reported that most of the dietary S ingested by ruminants through feed is converted to sulfate by rumen microorganisms, especially bacteria [50,57]. The same occurs with amino acids that contain S; they are fermented to sulfate [63], which is used together with lactate as a substrate by SRB to produce sulfide, which is combined with H_2 to form hydrogen sulfide (H_2S) [58,64]. In this study, the S in the diets was not quantified, but the highest H_2S production without the inclusion of GAA was observed in the AH10 diet, while the lowest H_2S production was observed in the AH100 diet; therefore, it can be assumed that another ingredient in the diets likely contributed S, causing variations in the production of H_2S. This assertion is supported by the metabolic process of H_2S production described above and by the findings reported by Smith et al. [65], who reported that increasing the amount of S in the diet from 2 to 8 g kg^{-1} DM increased H_2S production by more than 470%. In addition, there is a negative correlation between pH and H_2S production that is attributed to the protonation of aqueous sulfide [66], which inhibits the activity of SRBs [67]. Therefore, the production of H_2S requires an acidic rumen environment [6], preferably with a pH in a range of 5.5 to 6.5 [68]. In this study pH was in the range of 7.22 ± 0.26. (average ± standard deviation), so it cannot be ruled out that the low production of H_2S was a consequence of the pH level. On the other hand, regardless of the amount of S available, in the three diets, most of the GAA inclusion doses presented a lower H_2S production compared to the 0 g g^{-1} DM diet dose, and although the ratio is not known with certainty, it seems that the inclusion of GAA caused an inhibitory effect or an unfavorable environment for the activity of SRBs.

4.5. In Vitro Rumen Fermentation Profile and CH_4 Conversion Efficiency

The rumen fermentation profile can be used as a measure or indicator of rumen health, feed digestibility and digestion efficiency. Rumen pH is vital for the persistence and stability of rumen microorganisms [69], while DMD, SCFA and metabolizable energy (ME) are useful as indicators of the digestibility and energy value of the feed [41,70]. In the current study, the pH at the end of fermentation ranged between 6.83 and 7.64, values that are within the range reported in other studies [71,72], and of the three diets, the AH25 diet had the highest pH, while the AH10 diet had the lowest pH. These results agree with those reported by Nemati et al. [73], who observed that increasing the percentage of AH from 15 to 30% in the diet increased the pH to a higher level than that associated with the control treatment. This is attributed to the high buffering capacity and the low content of water-soluble carbohydrates that alfalfa presents, which makes it difficult to lower the pH [74]. In addition, during the deamination of proteins, ammonia is produced, which provides additional buffering to the rumen to maintain a relatively constant pH [75]. However, the DMD, the SFCA and the ME were negatively affected by the increase in the percentage of hay, so the AH25 diet obtained the lowest values, and the diet containing 10% AH was associated with the highest values, whereas the 100% hay diet presented intermediate values. Considering that the diet influences the rumen pH and, in turn, the digestion and metabolism of nutrients [76], it is possible that the low DMD in the AH25 diet is due to the high pH level, which reduced the degradation capacity of ruminal microbes [6]. In addition, alfalfa presents a high concentration of phenolic compounds with antimicrobial bioactivity [19], which is another possible reason for the low DMD in this diet. On the other hand, the diet with 10% hay presented higher values than the AH25 diet, which is attributed to the lower percentage of alfalfa. In the case of the AH100 diet, although it presented a DMD higher than that obtained in the AH25 diet, it is important to mention that in this diet, there was no other ingredient, so the high DMD is attributed to the structure of fibrous carbohydrates. In all diets, DMD enhanced the production of SFCA and ME, since both are end products of rumen fiber fermentation [77] and positively correlated with DMD [9]. On the other hand, it has been reported that the inclusion of GAA in the diet increases the rumen microbial population and the digestibility of nutrients [26,48], which consequently influence SCFA and ME. Therefore, the high fermentation profile can be attributed to an

improved rumen microbial population and nutrient digestibility, which influenced total SCFAs. In addition, the improvement in SCFA and ME evidences the role played by GAA in energy metabolism, which leads to greater energy efficiency [24]; although it seems that the conversion efficiency of CH_4 in the AH10 diet decreased, it is important to highlight that it showed higher DMD and therefore increased the production of gases and the final products of fermentation, including CH_4.

5. Conclusions

It is concluded that the positive effects of the addition of GAA depend on the percentage of AH in the diet and that the diets with 25 and 100% AH showed very little improvement with the addition of GAA, possibly representing an unnecessary expense. In contrast, the diet with 10% AH showed the best results with a dose equal to or greater than 0.0015 g, especially with a dose of 0.0020 g, which increased GP, CH_4, DMD, SCFA and ME and decreased the H_2S and CH_4 per unit of OM without affecting CO production, the proportion of CH_4 and the CH_4 per unit of SCFA and ME. Therefore, an in vivo evaluation of a diet containing 10% AH with doses of 0.0015 and 0.0020 g GAA g^{-1} DM is suggested in order to validate that GAA can be used as a strategy to mitigate the production of greenhouse gases in ruminants.

Author Contributions: Conceptualization, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R. and A.Z.M.S.; methodology, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R., O.V.V.-M., J.A.C.-D.-J. and A.Z.M.S.; software, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R. and A.Z.M.S.; validation, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R. and A.Z.M.S.; formal analysis, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R. and A.Z.M.S.; investigation, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R. and A.Z.M.S.; resources, M.M.M.Y.E. and A.Z.M.S.; data curation, M.M.M.Y.E. and E.R.A.-R.; writing—original draft preparation, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R. and M.J.A.; writing—review and editing, M.M.M.Y.E., E.R.A.-R., V.A.-Y., M.B.-R., D.A.M.-M., O.V.V.-M. and M.J.A.; visualization, A.Z.M.S.; supervision, A.Z.M.S.; project administration, A.Z.M.S.; funding acquisition, A.Z.M.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: This study did not require ethical review or approval from any educational institution because the rumen fluid was obtained from animals that were sacrificed in the municipal slaughterhouse of Toluca, State of Mexico, Mexico. However, it is important to mention that said place is legally regulated by the official Mexican norm NOM-033-ZOO-1995, which establishes the methods for the humane slaughter of domestic and wild animals.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Zhang, Q.; Wu, S.; Zou, X.; Ruan, S.; Kholif, A.E.; Hu, L.; Chen, H.; Zhou, W. Effects of *Neolamarckia cadamba* leaves extract on methanogenesis, microbial community in the rumen and digestibility of stylo silage. *J. Clean. Prod.* **2022**, *369*, 133338. [CrossRef]
2. Ebeid, H.M.; Mengwei, L.; Kholif, A.E.; Hassan, F.U.; Lijuan, P.; Xin, L.; Chengjian, Y. *Moringa oleifera* oil modulates rumen microflora to mediate in vitro fermentation kinetics and methanogenesis in total mix rations. *Curr. Microbiol.* **2020**, *77*, 1271–1282. [CrossRef]
3. Hristov, A.N.; Oh, J.; Firkins, J.L.; Dijkstra, J.; Kebreab, E.; Waghorn, G.; Makkar, H.P.S. SPECIAL TOPICS—Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options 1. *J. Anim. Sci.* **2013**, *91*, 5045–5069. [CrossRef]
4. Schulmeister, T.M.; Ruiz-Moreno, M.; Benitez, J.; Ponce, C.H.; Lamb, G.C.; DiLorenzo, N. Potential of cull banana fruit at two maturity stages as a feed supplement for cattle: Effects on in vitro ruminal fermentation, kinetics of gas production and digestibility. *Waste Biomass Valorization* **2020**, *11*, 6689–6695. [CrossRef]
5. Qian, K.; Xu, J.; Zu, H.C.; Cong, Y.Y. Research progress of rumen hydrogen sulfide production in ruminants. *Anim. Sci. J.* **2020**, *91*, e13349. [CrossRef] [PubMed]
6. Binversie, E.Y.; Ruiz-Moreno, M.; Carpenter, A.J.; Heins, B.J.; Crawford, G.I.; Di Costanzo, A.; Stern, M.D. Effects of dietary roughage and sulfur in diets containing corn dried distillers grains with solubles on hydrogen sulfide production and fermentation by rumen microbes in vitro. *J. Anim. Sci.* **2016**, *94*, 3883–3893. [CrossRef] [PubMed]

7. Galyean, M.L.; Hales, K.E. Feeding Management Strategies to Mitigate Methane and Improve Production Efficiency in Feedlot Cattle. *Animals* **2023**, *13*, 758. [CrossRef]
8. Li, S.Y.; Wang, C.; Wu, Z.Z.; Liu, Q.; Guo, G.; Huo, W.J.; Zhang, J.; Chen, L.; Zhang, Y.L.; Pei, C.X.; et al. Effects of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion, rumen fermentation and blood metabolites in Angus bulls. *Animal* **2020**, *12*, 2535–2542. [CrossRef]
9. Chen, T.; Wang, B.; Power, R.C.; Jiang, H. The first archaeobotanical evidence of *Medicago sativa* L. in China: Hay fodder for livestock. *Archaeol. Anthropol. Sci.* **2020**, *12*, 2. [CrossRef]
10. Zhang, Q.; Yu, Z.; Wang, X.G.; Na, R.S. Effects of chlorpyrifos and chlorantraniliprole on fermentation quality of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage inoculated with or without *Lactobacillus plantarum* LP. *Anim. Sci. J.* **2017**, *3*, 456–462. [CrossRef]
11. Al-Dobaib, S.N. Effect of different levels of Quebracho tannin on nitrogen utilization and growth performance of Najdi sheep fed alfalfa (*Medicago sativa*) hay as a sole diet. *Anim. Sci. J.* **2009**, *80*, 532–541. [CrossRef]
12. Chiquiní-Medina, R.A.; Castillo-Águilar, C.C.; Hernández-Sánchez, D.; Torres-Hernández, G.; Delgado-Licon, E. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in Campeche, Mexico, and its local integration in the diet of confined lambs. *Agroproductividad* **2018**, *11*, 69–74.
13. McDonald, I.; Baral, R.; Min, D. Effects of alfalfa and alfalfa-grass mixtures with nitrogen fertilization on dry matter yield and forage nutritive value. *J. Anim. Sci. Technol.* **2021**, *63*, 305. [CrossRef]
14. Alhidary, I.A.; Abdelrahman, M.M.; Alyemni, A.H.; Khan, R.U.; Al-Saiady, M.Y.; Amran, R.A.; Alshamiry, F.A. Effect of alfalfa hay on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of growing lambs with ad libitum access to total mixed rations. *Rev. Bras. Zootec.* **2016**, *45*, 302–308. [CrossRef]
15. Canton-Castillo, J.G.; Moguel-Ordoñez, Y.; Alcaraz-Romero, A.; Piña-Cardenas, B.; Betancur-Ancona, D. Effect of inclusion of alfalfa hay in the diet and gender on carcass and meat characteristics of Katahdin × Pelibuey lambs. *J. Appl. Poult. Res.* **2022**, *50*, 702–707. [CrossRef]
16. Ripoll, G.; Albertí, P.; Joy, M. Influence of alfalfa grazing-based feeding systems on carcass fat colour and meat quality of light lambs. *Meat Sci.* **2012**, *90*, 457–464. [CrossRef]
17. Rafińska, K.; Pomastowski, P.; Wrona, O.; Górecki, R.; Buszewski, B. *Medicago sativa* as a source of secondary metabolites for agriculture and pharmaceutical industry. *Phytochem. Lett.* **2017**, *20*, 520–539. [CrossRef]
18. Krakowska, A.; Rafińska, K.; Walczak, J.; Buszewski, B. Enzyme-assisted optimized supercritical fluid extraction to improve *Medicago sativa* polyphenolics isolation. *Ind. Crops Prod.* **2018**, *124*, 931–940. [CrossRef]
19. Plaizier, J.C. Replacing chopped alfalfa hay with alfalfa silage in barley grain and alfalfa-based total mixed rations for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 2495–2505. [CrossRef]
20. Xue, Z.; Liu, N.; Wang, Y.; Yang, H.; Wei, Y.; Moriel, P.; Palmer, E.; Zhang, Y. Combining Orchard grass and Alfalfa: Effects of forage ratios on in vitro rumen degradation and fermentation characteristics of silage compared with hay. *Animals* **2019**, *10*, 59. [CrossRef]
21. Lu, Y.F.; Zou, T.D.; Wang, Z.R.; Yang, J.; Li, L.H.; Guo, X.B. Dietary guanidinoacetic acid improves the growth performance and skeletal muscle development of finishing pigs through changing myogenic gene expression and myofibre characteristics. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2020**, *104*, 1875–1883. [CrossRef] [PubMed]
22. Ren, G.; Hao, X.; Zhang, X.; Liu, S.; Zhang, J. Effects of guanidinoacetic acid and betaine on growth performance, energy and nitrogen metabolism, and rumen microbial protein synthesis in lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2022**, *292*, 115402. [CrossRef]
23. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP); Bampidis, V.; Azimonti, G.; Bastos, M.D.L.; Christensen, H.; Dusemund, B.; Fasmon-Durjava, M.; Kouba, M.; Lòpez-Alonso, M.; Puente, S.L.; et al. Safety and efficacy of a feed additive consisting of guanidinoacetic acid for all animal species (Alzchem Trostberg GmbH). *EFSA J.* **2022**, *20*, e07269. [CrossRef]
24. Li, Z.; Liang, H.; Xin, J.; Xu, L.; Li, M.; Yu, H.; Zhang, W.; Ge, Y.; Li, Y.; Qu, M. Effects of dietary guanidinoacetic acid on the feed efficiency, blood measures, and meat quality of jinjiang bulls. *Front. Vet. Sci.* **2021**, *8*, 684295. [CrossRef] [PubMed]
25. Chao, Y.; Liu, B.; Kou, Q.; Niu, W.; Jiang, H.; Yang, L.; Zhang, G. Effects of guanidine acetic acid on growth performance, slaughter performance, fat deposition and nutritional components in muscle of stabling Tan sheep. *Chin. J. Clin. Nutr.* **2019**, *31*, 388–394. [CrossRef]
26. Li, W.-J.; Wu, Q.-C.; Cui, Z.-Y.; Jiang, Y.-W.; Aisikaer, A.; Zhang, F.; Chen, H.-W.; Wang, W.-K.; Wang, Y.-L.; Lv, L.-K.; et al. Guanidine acetic acid exhibited greater growth performance in younger (13–30 kg) than in older (30–50 kg) lambs under high-concentrate feedlotting pattern. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *1134*, 954675. [CrossRef]
27. Liu, C.; Wang, C.; Zhang, J.; Liu, Q.; Guo, G.; Huo, W.J.; Pei, C.X.; Chen, L.; Zhang, Y.L. Guanidinoacetic acid and betaine supplementation have positive effects on growth performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Angus bulls. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2021**, *276*, 114923. [CrossRef]
28. AOAC—Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16th ed.; AOAC: Arlington, VA, USA, 1997.
29. Van Soest, P.V.; Robertson, J.B.; Lewis, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **1991**, *74*, 3583–3597. [CrossRef] [PubMed]
30. Goering, H.K.; Van Soest, P.J. *Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications)*; US Agricultural Research Service: Washington, DC, USA, 1970; p. 379.
31. Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; McAllan, A.B.; France, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1994**, *48*, 185–197. [CrossRef]

32. Acosta, J.A.D.; Elghandour, M.M.; Mariezcurrena-Berasain, M.D.; Adegbeye, M.J.; Fajemisin, A.N.; Pliego, A.B.; Salem, A.Z. Effect of mid-term dietary administration of the *Caesalpinia coriaria* extract on the sustainable mitigation of equine fecal methane, carbon monoxide and hydrogen sulfide production. *J. Equine Vet. Sci.* **2022**, *115*, 104021. [CrossRef]
33. Tagliapietra, F.; Cattani, M.; Bailoni, L.; Schiavon, S. In vitro rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2010**, *158*, 197–201. [CrossRef]
34. Alvarado-Ramírez, E.R.; Maggiolino, A.; Elghandour, M.M.M.Y.; Rivas-Jacobo, M.A.; Ballesteros-Rodea, G.; Palo, P.D.; Salem, A.Z.M. Impact of co-ensiling of maize with *Moringa oleifera* on the production of greenhouse gases and the characteristics of fermentation in ruminants. *Animals* **2023**, *13*, 764. [CrossRef]
35. SAS (Statistical Analysis System). *User's Guide: Statistics*; Ver 9.0; SAS Institute: Cary, NC, USA, 2002.
36. France, J.; Dijkstra, J.; Dhanoa, M.S.; Lopez, S.; Bannink, A. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: Derivation of models and other mathematical considerations. *Br. J. Nutr.* **2000**, *2*, 143–150. [CrossRef]
37. Menke, K.H.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, D.; Schneider, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.* **1979**, *93*, 217–222. [CrossRef]
38. Getachew, G.; Makkar, H.P.S.; Becker, K. Tropical browses: Contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *J. Agric. Sci.* **2002**, *139*, 341–352. [CrossRef]
39. Soltan, Y.; Morsy, A.; Hashem, N.; Elazab, M.; Sultan, M.; Marey, H.; Lail, G.A.E.; El-Desoky, N.; Hosny, N.; Mahdy, A.; et al. Modified nano-montmorillonite and monensin modulate in vitro ruminal fermentation, nutrient degradability, and methanogenesis differently. *Animals* **2021**, *11*, 3005. [CrossRef] [PubMed]
40. Owens, F.N.; Basalan, M. Ruminal Fermentation. In *Rumenology*; Millen, D., De Beni Arrigoni, M., Lauritano Pacheco, R., Eds.; Springer: Cham, Switzerland, 2016; pp. 63–102. [CrossRef]
41. Faniyi, T.O.; Adewumi, M.K.; Jack, A.A.; Adegbeye, M.J.; Elghandour, M.M.Y.; Barbabosa-Pliego, A.; Salem, A.Z.M. Extracts of herbs and spices as feed additives mitigate ruminal methane production and improve fermentation characteristics in West African Dwarf sheep. *Trop. Anim. Health Prod.* **2021**, *53*, 312. [CrossRef]
42. Kholif, A.E.; Gouda, G.A.; Morsy, T.A.; Matloup, O.H.; Fahmy, M.; Gomaa, A.S.; Patra, A.K. Dietary date palm leaves ensiled with fibrolytic enzymes decreased methane production, and improved feed degradability and fermentation kinetics in a ruminal in vitro system. *Waste Biomass Valorization* **2022**, *13*, 3475–3488. [CrossRef]
43. Morsy, T.A.; Gouda, G.A.; Kholif, A.E. In vitro fermentation and production of methane and carbon dioxide from rations containing *Moringa oleifera* leave silage as a replacement of soybean meal: In vitro assessment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, *29*, 69743–69752. [CrossRef] [PubMed]
44. Alvarado-Ramírez, E.R.; Andrade-Yucailla, V.; Elghandour, M.M.M.Y.; Acosta-Lozano, N.; Rivas-Jacobo, M.A.; López-Aguirre, D.; Garay-Martínez, J.R.; Vázquez-Mendoza, P.; Barros-Rodríguez, M.; Salem, A.Z.M. Effects of Guanidinoacetic Acid on Ruminal Fermentation and Greenhouse Gas Production Using Fresh Forage and Silage from Different Maize (*Zea mays* L.) Genotypes. *Fermentation* **2023**, *9*, 437. [CrossRef]
45. Ren, G.D.; Hao, X.Y.; Zhang, X.Z.; Liu, S.; Zhang, H.X.; Tian, G.Y.; Zhang, J.X. Effects of Guanidinoacetic Acid and Betaine Supplementation on Growth Performance, Rumen Fermentation and Blood Metabolites in Lambs. *Sci. Agric. Sin.* **2023**, *56*, 766–778.
46. Sucu, E. Effects of microalgae species on in vitro rumen fermentation pattern and methane production. *Ann. Anim. Sci.* **2020**, *20*, 207–218. [CrossRef]
47. Li, W.; Cui, Z.; Jiang, Y.; Aisikaer, A.; Wu, Q.; Zhang, F.; Wang, W.; Bo, Y.; Yang, H. Dietary Guanidine Acetic Acid Improves Ruminal Antioxidant Capacity and Alters Rumen Fermentation and Microflora in Rapid-Growing Lambs. *Antioxidants* **2023**, *12*, 772. [CrossRef] [PubMed]
48. Liu, Y.; Zhang, J.; Wang, C.; Guo, G.; Huo, W.; Xia, C.; Chen, L.; Zhang, Y.; Pei, C.; Liu, Q. Effects of guanidinoacetic acid supplementation on lactation performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *103*, 1522–1529. [CrossRef]
49. Wang, K.; Xiong, B.; Zhao, X. Could propionate formation be used to reduce enteric methane emission in ruminants? *Sci. Total Environ.* **2022**, *855*, 158867. [CrossRef]
50. Patra, A.; Park, T.; Kim, M.; Yu, Z. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by anti-methanogenic compounds and substances. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2017**, *8*, 1–18. [CrossRef]
51. Li, T.T.; Wang, J.L.; Zhang, N.Z.; Li, W.H.; Yan, H.B.; Li, L.; Jia, W.Z.; Fu, B.Q. Rapid and visual detection of *Trichinella* spp. Using a lateral flow strip-based recombinase polymerase amplification (LF-RPA) assay. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2019**, *9*, 1. [CrossRef]
52. Choudhury, P.K.; Jena, R.; Tomar, S.K.; Puniya, A.K. Reducing Enteric Methanogenesis through Alternate Hydrogen Sinks in the Rumen. *Methane* **2022**, *1*, 320–341. [CrossRef]
53. Mills, J.A.N.; Dijkstra, J.; Bannink, A.; Cammell, S.B.; Kebreab, E.; France, J.A. Mechanistic model of whole-tract digestion and methanogenesis in the lactating dairy cow: Model development, evaluation, and application. *J. Anim. Sci.* **2001**, *79*, 1584–1597. [CrossRef]
54. Kholif, A.E.; Olafadehan, O.A. Essential oils and phytogenic feed additives in ruminant diet: Chemistry, ruminal microbiota and fermentation, feed utilization and productive performance. *Phytochem. Rev.* **2021**, *20*, 1087–1108. [CrossRef]

55. Wu, H.; Li, Y.; Meng, Q.; Zhou, Z. Effect of high sulfur diet on rumen fermentation, microflora, and epithelial barrier function in steers. *Animals* **2021**, *11*, 2545. [CrossRef]
56. Zhao, Y.; Xie, B.; Gao, J.; Zhao, G. Dietary supplementation with sodium sulfate improves rumen fermentation, fiber digestibility, and the plasma metabolome through modulation of rumen bacterial communities in steers. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01412-20. [CrossRef]
57. Haarstad, K.; Bergersen, O.; Sørheim, R. Occurrence of carbon monoxide during organic waste degradation. *J. Air Waste Manag. Assoc.* **2006**, *56*, 575–580. [CrossRef]
58. Ragsdale, S.W. Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1125*, 129–136. [CrossRef] [PubMed]
59. Biester, A.; Marcano-Delgado, A.N.; Drennan, C.L. Structural Insights into Microbial One-Carbon Metabolic Enzymes Ni–Fe–S-Dependent Carbon Monoxide Dehydrogenases and Acetyl-CoA Synthases. *Biochemistry* **2022**, *61*, 2797–2805. [CrossRef]
60. Speer, H.F.; Pearl, K.A.; Titgemeyer, E.C. Relative bioavailability of guanidinoacetic acid delivered tilizati or abomasally to cattle. *J. Anim. Sci.* **2020**, *98*, skaa282. [CrossRef] [PubMed]
61. Ragsdale, S.W. Life with carbon monoxide. Crit. *Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *39*, 165–195. [CrossRef] [PubMed]
62. Techtmann, S.M.; Colman, A.S.; Robb, F.T. 'That which does not kill us only makes us stronger': The role of carbon monoxide in thermophilic microbial consortia. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 1027–1037. [CrossRef]
63. Coleman, G.S. A sulfate-reducing bacterium from the sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* **1960**, *22*, 423–436. [CrossRef] [PubMed]
64. Castro, D.J.; Cerón-Cucchi, M.E.; Ortiz-Chura, A.; Depetris, G.J.; Irazoqui, J.M.; Amadio, A.F.; Cantón, G.J. Ruminal effects of excessive dietary sulphur in feedlot cattle. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2021**, *106*, 978–987. [CrossRef] [PubMed]
65. Smith, D.R.; DiLorenzo, N.; Leibovich, J.; May, M.L.; Quinn, M.J.; Homm, J.W.; Galyean, M.L. Effects of sulfur and monensin concentrations on in vitro dry matter disappearance, hydrogen sulfide production, and volatile fatty acid concentrations in batch culture ruminal fermentations. *J. Anim. Sci.* **2010**, *88*, 1503–1512. [CrossRef]
66. Felix, T.L.; Murphy, T.A.; Loerch, S.C. Effects of dietary inclusion and NaOH treatment of dried distillers grains with solubles on ruminal metabolism of feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90*, 4951–4961. [CrossRef]
67. Wu, H.; Meng, Q.; Yu, Z. Effect of pH buffering capacity and sources of dietary sulfur on rumen fermentation, sulfide production, methane production, sulfate reducing bacteria, and total Archaea in vitro rumen cultures. *Bioresour. Technol.* **2015**, *186*, 25–33. [CrossRef]
68. Fang, H.H.; Liu, H. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresour. Technol.* **2002**, *82*, 87–93. [CrossRef] [PubMed]
69. Penner, G.B. Influence of microbial ecology in the rumen and lower gut on production efficiency of dairy cows. In Proceedings of the Tri-State Dairy Nutrition Conference, Fort Wayne, IN, USA, 18–20 April 2016; pp. 75–81.
70. Azar, M.S.; Doust-Nober, R.S.; Sis, N.M.; Shahryar, H.A.; Asadi, Y. Effects of Zataria multiflora extract as rumen modifier using in vitro gas production technique. *Curr. Res. J. Biol. Sci.* **2012**, *4*, 350–354.
71. Shen, Z.; Seyfert, H.M.; Lohrke, B.; Schneider, F.; Zitnan, R.; Chudy, A. An energy rich diet causes rumen papillae proliferation associated with more IGF type1 receptors and increased plasma IGF-1 concentrations in young goats. *J. Nutr.* **2004**, *134*, 11–17. [CrossRef]
72. Krause, K.M.; Oetzel, G.R. Understanding and preventing sub-acute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2006**, *126*, 215–236. [CrossRef]
73. Nemati, M.; Amanlou, H.; Khorvash, M.; Mirzaei, M.; Moshiri, B.; Ghaffari, M.H. Effect of different alfalfa hay levels on growth performance, rumen fermentation, and structural growth of Holstein dairy calves. *J. Anim. Sci.* **2016**, *94*, 1141–1148. [CrossRef] [PubMed]
74. Huo, W.; Wang, X.; Wei, Z.; Zhang, H.; Liu, Q.; Zhang, S.; Wang, C.; Chen, L.; Xu, Q.; Guo, G. Effect of lactic acid bacteria on the ensiling characteristics and in vitro ruminal fermentation parameters of alfalfa silage. *Ital. J. Anim. Sci.* **2021**, *20*, 623–631. [CrossRef]
75. Matthews, C.; Crispie, F.; Lewis, E.; Reid, M.; O'Toole, P.W.; Cotter, P.D. The rumen microbiome: A crucial consideration when tilizatio milk and meat production and nitrogen tilization efficiency. *Gut. Microbes* **2019**, *10*, 115–132. [CrossRef]
76. Cui, Y.; Liu, H.; Gao, Z.; Xu, J.; Liu, B.; Guo, M.; Shi, Y. Whole-plant corn silage improves rumen fermentation and growth performance of beef cattle by altering rumen microbiota. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2022**, *106*, 4187–4198. [CrossRef] [PubMed]
77. Luo, Y.; Pfister, P.; Leisinger, T.; Wasserfallen, A. The genome of archaeal prophage ψM100 encodes the lytic enzyme responsible for autolysis of *Methanothermobacter wolfeii*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 5788–5792. [CrossRef] [PubMed]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

7.2 Artículo asociado al estudio *in vitro* 2 publicado en la revista *Journal of Agriculture and Food Research*. La referencia bibliográfica se presenta a continuación:

Vazquez-Mendoza, O. V., Elghandour, M. M., Berasain, M. A. M., Inyang, U. A., Jack, A., Lackner, M., & Salem, A. Z. (2024). Guanidinoacetic acid effects on ruminal fermentation, digestibility and methane production in sheep liquor: Dose-response analysis. *Journal of Agriculture and Food Research*, *18*, 101540. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101540

Journal of Agriculture and Food Research 18 (2024) 101540

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Agriculture and Food Research

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/journal-of-agriculture-and-food-research

Guanidinoacetic acid effects on ruminal fermentation, digestibility and methane production in sheep liquor: Dose-response analysis

Oscar Vicente Vazquez-Mendoza [a], Mona M.M.Y. Elghandour [a,***], Maria A. Mariezcurrena Berasain [a], Udoh A. Inyang [b], Akaninyene Jack [b], Maximilian Lackner [c,**], Abdelfattah Z.M. Salem [a,*]

[a] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, Mexico
[b] Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Uyo, Uyo, Akwa Ibom State, Nigeria
[c] Faculty of Industrial Engineering, University of Applied Sciences Technikum Wien, Hoechstaedtplatz 6, 1200, Vienna, Austria

ARTICLE INFO

Keywords:
Guanidinoacetic acid
Greenhouse gases
Fermentation kinetics
Digestibility

ABSTRACT

Guanidinoacetic acid (GAA), a precursor of creatine, is partially degraded in the rumen when unprotected. While GAA has shown promise as a feed additive, its optimal dose for ruminants remains unclear. This study investigated the dose-response effects of GAA on *in vitro* ruminal fermentation and greenhouse gas production in fattened sheep. Rumen inoculum from two Pelibuey sheep (30 kg ± 2 kg) fed a 50:50 forage: concentrate diet was used to test seven GAA doses: 0 (GAA0, control), 500 (GAA0.5), 1000 (GAA1), 1500 (GAA1.5), 2000 (GAA2), 2500 (GAA2.5), and 3000 (GAA3) mg/kg DM (dry matter). A completely randomized design was employed. GAA0.5 produced significantly higher total gas than GAA2. The CH_4 production was similar across doses, except for GAA2.5, which was significantly higher than GAA0 and GAA0.5. GAA exhibited quadratic relationships with total gas production and linear relationships with CH_4 and CO production but no significant effect on H_2S. GAA linearly increased DM digestibility without significantly affecting ruminal fermentation profiles. GAA inclusion strongly influenced crude protein (CP) digestibility and degradability kinetics, with varying effects at different time points. The rate constant for degradation of the insoluble but potentially degradable CP fraction was highest with GAA1. In conclusion, GAA supplementation at GAA0.5 improved total gas production without increasing CH_4 emissions, implying enhanced fermentation efficiency and improved performance. GAA's impact on CP digestibility varied with incubation time. These findings provide insights into developing optimal GAA dose/level supplementation that is effective in fattening sheep, though further *in vivo* studies are warranted to validate these effects and explore long-term impacts on rumen microbial populations and protein utilization.

1. Introduction

The rumen of ruminants is the primary site for fermentation of ingested nutrients. This process, carried out by microorganisms, generates volatile fatty acids (VFA: acetate, propionate, butyrate), which are the animal's primary energy source [1,2]. Additionally, microbial protein serves as an important source of protein and amino acids for the host [3,4].

During ruminal fermentation, by-products such as CO_2 and H_2 are produced and converted into methane (CH_4) by methanogens [5–7]. Methane production represents an energy loss for the animal (13.3 Mcal/kg CH_4) and contributes to greenhouse gas emissions [8,9].

Maximizing the shift in the flow of metabolic hydrogen (H_2) in the rumen away from CH_4 and toward VFA would increase the efficiency of ruminant production and decrease its environmental impact [10]. Suggestions such as inhibiting methanogenesis to favour microbial biomass production as an alternative hydrogen sink and metabolic hydrogen incorporation into excess NADH have been made [10] but with limited

* Corresponding author.
** Corresponding author.
*** Corresponding author.
E-mail addresses: mmohamede@uaemex.mx (M.M.M.Y. Elghandour), maximilian.lackner@technikum-wien.at (M. Lackner), salem@uaemex.mx, asalem70@yahoo.com (A.Z.M. Salem).

https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101540
Received 25 September 2024; Received in revised form 22 November 2024; Accepted 23 November 2024
Available online 26 November 2024
2666-1543/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

success. To improve the energetic efficiency of animals while reducing environmental hazards like CH_4 emissions, the rumen microbes thus become the main target [10]. Very efficient animals are noted for less CH_4 and more milk production while consuming less feed owing to their unique set of rumen microbes [11]. Concerted efforts are being made to manipulate rumen fermentation and the rumen microbes, especially those associated with methane and other obnoxious gases [12–14], depending on feed (type and level) and production. The basic principle underlying such strategies is the alteration in ruminal microflora that can be achieved by dietary intervention and the use of additives that selectively affect rumen microbial communities. Ruminant production improvement is possible with rumen fermentation manipulation to increase total VFA and propionate production while decreasing methane emissions [15].

Many feed additives such as antibiotics, ionophores, and defaulting agents (eg. capric acid, lauric acid, and myristic acid against protozoa) have been utilized to mediate rumen fermentation to improve the productivity of ruminants and reduce methanogenesis. Antibiotics are discouraged, though, due to the formation of antimicrobial resistance and the emergence of multi-resistant bacteria that can also endanger human health. Guanidinoacetic acid (GAA), $H_2NC(=NH)NHCH_2CO_2H$, CAS no. 352-97-6, is an amino acid derived and a direct precursor of creatine [16,17] but, in its unprotected form, can be degraded by rumen microbiota and be used as a nitrogen source [18]. The GAA was used foremost in humans, chickens, and pigs [19]. Several studies have shown that GAA could improve growth performance, promote muscle development, and improve the general health status in monogastric (poultry and pigs) when used as a feed additive b [20,21]. Recently, scientists have been interested in studying the effect of supplementing ruminants with GAA. Improved rumen VFA production, microbial growth, growth performance, nutrient digestibility, and enzyme activity at 0.6 and 0.9 g GAA/kg DM have been reported [22]. Improved growth performance and meat quality in lambs [23] at 1 g/kg DM GAA has been established. Moreover, an enhanced antioxidant effect has been noted on the rumen in ruminants [23]. Interestingly, GAA supplementation has been found to affect ruminal fermentation patterns. Including GAA at 0.20, 0.40, 0.60, and 0.80 % led to an increase in microbial protein and propionate, while gas production (GP), pH, and methane were unaffected [24]. The addition of GAA at levels of 0.03, 0.05, 0.07, 0.09, 0.11, 0.13, and 0.15 % to diets of sheep proved effective in improving GP, VFA and microbial protein while propionate increased numerically [25]. Given the variability in responses observed in recent studies, it is necessary to establish the optimal GAA dosage for ruminal fermentation in sheep under feedlot conditions. It was hypothesized that a dose between 0 and 3000 mg/kg optimizes ruminal fermentation without significantly increasing methane production. This *in vitro* experiment aims to determine this optimal GAA dose by evaluating its effects on ruminal gas production, greenhouse gas production, fermentation, and degradation parameters in fattened sheep liquor. By examining a wider range of doses (0–3000 mg/kg), It was expected to provide a more comprehensive understanding of GAA effects and probable mechanisms on ruminal fermentation and gas production, thus contributing to developing more efficient and environmentally sustainable feeding strategies in sheep production systems. Sheep are a main source of meat globally, and they are also used extensively for wool production.

2. Materials and methods

2.1. Experimental treatments and substrate

This study was carried out in the animal nutrition laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science of the Autonomous University of the State of Mexico and the animal nutrition laboratory of the Central Laboratory of the Faculty of Engineering and Sciences of the Autonomous University of Tamaulipas, Mexico. The guanidinoacetic acid (GAA; GuanAMINO®, Evonik Operations GmbH, Germany) used was 96 % pure. The doses of GAA deployed in this work were based on previous studies [25–27] but considering the degradation rate in the rumen [18] and were 0 (GAA0, control), 500 (GAA0.5), 1000 (GAA1), 1500 (GAA1.5), 2000 (GAA2), 2500 (GAA2.5), and 3000 (GAA3) mg/kg dry matter (DM). As substrate, a diet was formulated to meet the requirements of fattening sheep [28] as shown in Table 1.

Diet samples were dried at 65 °C for 48 hours in a forced air oven and subsequently ground in a Wiley mill (Thomas Wiley® Laboratory Mill model 4, Swedesboro, NJ, USA) with a 1 mm sieve and stored in plastic jars for subsequent chemical composition determination and *in vitro* incubation. Chemical analysis of the diets was performed by near-infrared spectroscopy (NIR) using a spectrophotometer (FT-NIR TANGO®, Bruker Optik GmbH, Germany) equipped with the calibration curves for finished ruminant feeds (AMINONIR® FEEDS, Evonik Operations GmbH, Germany) for determination of the dry matter, ash, crude protein (N content multiplied by 6.25), ether extract, crude fibre, neutral detergent fibre, acid detergent fibre, starch, sugar, phosphorus, and crude energy, and all calibrations are based on official methods [29,30].

2.2. In vitro incubations for the experiment 1 and 2

In experiment 1, rumen inoculum was collected from 4 Pelibuey sheep weighing 40 kg ± 2 kg, fed a diet based on ground maize, soybean meal, vitamin-mineral premix, and maize stubble with a forage-to-concentrate ratio of 50:50. The rumen fluid was collected in a thermos flask and immediately transported to the laboratory, filtered through four layers of gauze and stored in a 2000 mL Erlenmeyer flask in a water bath at 39 °C with a constant flow of CO_2. The nutrient medium contained a buffer solution, macro and micro minerals, resazurin, and distilled water [31] in a 9:1 v/v ratio, using a magnetic stirrer, ensuring that this mixture was maintained at 39 °C. Prior to incubation, 1000 mg of substrate were weighed and placed in a 160 mL glass bottle; then, doses of GAA, 90 mL of nutrient solution, and 10 mL of rumen inoculum

Table 1
Ingredients and composition of diets used as substrates.

Ingredients	Inclusion rate, % DM
Corn grain	47.90
Wheat bran	23.00
Corn stover	15.00
Soybean meal	11.50
Vitamin and mineral premix[a]	2.00
Calcium carbonate	0.40
Inert[b]	0.30
Nutrients, % DM[c]	
Dry matter, % as is	89.45
Crude protein, %	15.84
Crude fiber, %	11.27
Metabolizable energy, MJ/kg DM[d]	11.35
Gross energy, MJ/kg DM	18.00
Ether extract, %	3.78
Neutral detergent fiber, %	34.23
Acid detergent fiber, %	14.67
Ash, %	6.66
Starch, %	34.08
Sugar. %	4.09
Ca, %[e]	0.80
P, %	0.62

DM, dry matter; [d,e] Calculated values from the National Research Council (2007).

[a] Vitamin and mineral premix provide the following per-kg: 240 g Ca; 30 g P; 20 g Mg; 80 g Na; 120 g Cl; 5 g K; 5 g S; 5 mg Cr; 4000 mg Mn; 2000 mg Fe; 5000 mg Zn; 100 mg I; 30 mg Se; 60 mg Co; 500000 UI A vitamin; 150000 UI D vitamin; 1000 UI E vitamin.

[b] Inert component was bentonite and the inclusion rate of Guanidinoacetic Acid in the diet was at the expense of the inert component.

[c] Measurement of nutrients by NIRs with AMINONIR® FEEDS calibration, Evonik Operations GmbH.

were added maintaining a 9:1 v/v ratio. The bottles under CO_2 flow were immediately closed with rubber stoppers and aluminum seals, shaken, and placed in a bath (Forma Scientific Model 2564 Shaker Bath, Division of Mallincrodt. Inc. OH, USA) at 39 °C [32]. Each treatment, including control (GAA0), was incubated in quadruplicate, and three flasks without substrate were used as blanks to correct the gas measurement. All treatments were handled under identical experimental conditions, using the same batch of rumen inoculum. The temperature was continuously monitored throughout the incubation period, and bottles remained sealed to maintain anaerobic conditions (which was checked by resazurin discoloration). Total gas production values from blank bottles were subtracted from all treatment measurements. Total gas production (GP) was recorded at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 19, 24, 24, 30, 48, 60 and 72 hours using a pressure transducer (Manometer Delta OHM® model HD2124.1, Seneca Italy Srl. Italy)- [33].

In experiment 2, the rumen inoculum was obtained from 2 sheep (45 ± 2 kg) slaughtered at the municipal slaughterhouse in Toluca, Mexico State, Mexico. The rumen liquid was placed in a thermos flask and transported to the laboratory, where it was filtered through four layers of gauze and kept at 39 °C until use. The nutrient medium comprised a buffer solution, macro and micro minerals, resazurin, and distilled water [34]. Prior to incubation, the rumen inoculum and the nutrient medium were mixed in a 1:4 ratio (v/v) under constant stirring and kept at 39 °C. For incubation, 500 mg of each diet was weighed and placed in 120 mL glass bottles with the doses of GAA and 50 mL of the nutrient medium mixture with the rumen inoculum. The bottles were immediately closed with rubber stoppers and an aluminum seal and placed in a water bath (BINDER Incubator Model FD115, Germany).

Each treatment, including control (GAA0), was incubated in triplicate, and three flasks without substrate were used as blanks to correct the gas measurement. All treatments were handled under identical experimental conditions, using the same batch of rumen inoculum. The temperature was continuously monitored throughout the incubation period, and the bottles remained sealed to maintain anaerobic conditions. Gas production values (GP, CH_4, CO, and H_2S) from blank bottles were subtracted from all treatment measurements. The GP was recorded at 2, 4, 12, 24, 27, 30 and 48 hours using a pressure transducer (Manometer model 407910, Extech® Instruments, Nashue, NH, USA). In addition, the production of methane (CH_4), carbon monoxide (CO), and hydrogen sulfide (H_2S) in the headspace of the bottles was quantified using a portable diffusion-based gas detector (Dräger X-am®, model 2500, Dräger, Lübeck, SH, Germany) in the same hours as the GP. After each measurement, in both experiments, the gas accumulated in the headspace of the bottles was released to avoid the dissolution of the gases in the liquid phase and decrease the source of error [35].

2.3. Apparently degraded substrate

In both experiments, after sampling the supernatant for pH determination using a pH meter (Conductronic pH15, Puebla, Mexico), the contents of each bottle were vacuum filtered through sintered glass crucibles (Duran® coarse porosity no. 1, pore size 100–160 μm; Germany). The incubation residues were then dried at 100 °C overnight to estimate the apparent disappearance of DM (ADM). DM degradability at 72 hours of incubation was calculated as the difference between the DM content of the substrate and its non-degradable DM [33].

2.4. Calculation of fermentation kinetics parameters

To estimate the gas production (GP) kinetics parameters in experiment 1 and CH_4, CO, O_2, and H_2S in experiment 2, the results of GP, CH_4, CO, and H_2S (mL/g DM) were fitted using the NLIN option of SAS [36] using a non-linear model [37]:

$$A = b \times \left(1 - e^{-c(t-Lag)}\right)$$

where A is the volume of GP, CH_4, CO, and H_2S at time t; b the asymptotic production of gas, CH_4, CO, and H_2S (mL/g DM); c is the rate of GP, CH_4, CO, and H_2S (/hour), and *Lag* (hour) the *lag* or colonization time before gas, CH_4, CO and H_2S production starts.

Metabolizable energy (ME) was calculated from the GP of 200 mg of the substrate and the crude protein (CP), ether extract (EE), and ash (CEN) content of the substrate [31]:

$$SCFA(mmol/(200\ mg\ DM)) = 0.0222\ GP24 - 0.00425$$

Where GP24 is the net gas production in mL of 200 mg dry sample after 24 hours of incubation.

The concentration of short-chain fatty acids (SCFA) was calculated from GP24 [38] as follows:

where GP24 is the net gas production at 24 hours (mL/200 mg DM).

Digestible organic matter (DOM) was also calculated from GP24 using the following formula [39]:

$$DOM\ (\%\ DM) = 13.3 \times GP24 - 0.05PG24^2 + 511 \times CP + 76 \times EE + 91.2$$

where GP is the net gas production in mL of 200 mg dry sample after 24 hours of incubation, all CP and EE values were expressed in g/100 g DM.

2.5. Apparent digestibility of DM and CP

The nylon bag technique [40] was used with methodological modifications proposed by ANKOM Technology Corporation [41] and adaptations consisting of the use of 900 mL glass bottles with an individual bubble Airlock and rubber stopper (Home Brew Ohio, USA) in the lid to allow the release of gases generated during fermentation. ANKOM filter bags (F57, ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, USA) were used, identified with a pencil, and dried at 60 °C to constant weight. 450 mg of dry substrate was weighed and placed in bags with the GAA doses in triplicate for each time evaluated. The bags were then sealed using a heat sealer (Impulse Sealer, ANKOM Technology Corporation, Macedon, NY, USA) and placed in the adapted digestion flasks (16 bags per flask). The ruminal inoculum was obtained via oesophageal route from six growing lambs (Pelibuey 24 ± 0.3 kg body weight) fed a diet based on ground corn, soybean paste, vitamin-mineral premix, and corn stover with a forage concentrate ratio of 50:50.

The collected ruminal fluid was placed in a thermos flask and immediately taken to the laboratory, where it was filtered through four layers of gauze and stored in a 2000 mL Erlenmeyer flask in a water bath at 39 °C with constant CO_2 flow until use. The nutrient medium consisted of a buffer solution, macro and micro minerals, resazurin, and distilled water [31]. An empty bag was inoculated into each flask and served as a blank to correct the data. Subsequently, 800 mL of a 1:4 (v/v) mixture of rumen liquid and nutrient medium was added to each fermentation flask. Seven flasks, one separate flask per GAA dose, were used and placed in a water bath incubator with constant circular agitation (SHELDON MANUFACTURING INC. Cornelius, OR, USA) at 39.2 ± 0.5 °C. The bags were incubated for 48 hours. Bags in triplicate from each treatment were removed from the flasks at 0, 6, 12, 24, and 48 hours, washed with water, and then dehydrated in a forced air oven at 65 °C to constant weight to determine residual DM. Finally, the crude protein content was determined by multiplying the nitrogen content by a factor of 6.25, and the nitrogen (954.01) was measured using the Kjeldahl method [29]. With this data, the apparent digestibility of DM and CP was calculated according to the proposed formulas [41].

2.6. Calculation of degradation kinetics

The DM and CP disappearance data of the seven treatments at the five incubation times of the bags were used to calculate the degradation kinetics using a non-linear model [40]:

$$P = a + b\,(1 - exp^{-ct})$$

Where P is the potential degradability, t is the incubation time, an intercept with the y-axis at time zero represents the soluble and fully degradable substrate that rapidly leaves the ANKOM bag, b the difference between the intercept (a) and the asymptote representing the insoluble but potentially degradable fraction of the substrate which is degraded by the microorganisms according to a first order kinetic process, c is the degradation rate constant of the b fraction. Equations were fitted for degradation profiles using the NLIN procedure of SAS 9.4 [36].

The effective degradability of the b-fraction (DEb) of DM and CP was calculated using numerical methods using the Solver function of the Microsoft Office Excel program [42].

2.7. Statistical analysis

The design of the three experiments followed a completely randomized design under controlled laboratory conditions. Prior to analysis, data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test ($P > 0.05$) and homogeneity of variance using Bartlett's test ($P > 0.05$). The data from the four replicates for total gas production and three replicates for CH_4, CO, H_2S, apparent digestibility, and degradation kinetics were averaged for each treatment in each run, serving as the experimental unit. The analysis was conducted using the GLM procedure in SAS [36] with the following statistical model:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + \varepsilon_{ijk}$$

Where: Y_{ijk} is the response variable, μ is the general mean, A_i is the effect of GAA levels (i = 0 (control), 500, 1000, 1500, 2000, 2500, and 3000 mg/kg), and ε_{ijk} is the experimental error, assumed to be normally distributed with mean zero and constant variance. Treatment means were compared using Tukey's HSD test with significance set at $P \leq 0.05$. Both linear and quadratic effects of increasing GAA levels were evaluated, and their respective P-values were reported. For variables showing significant quadratic effects, the optimal dose was calculated by taking the first derivative of the quadratic equation and setting it equal to zero.

3. Results

3.1. Ruminal total gas and CH_4 production and kinetics

The effect of guanidinoacetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on ruminal total gas and CH_4 production and kinetics of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum is as presented in Table 2. The GAA inclusion was similar across the treatments at 6 h, except that the inclusion at 500 was significantly higher than at 2000 mg/kg DM. The CH_4 production rate was identical with the inclusion of 0, 500, 1000, 1500, 2000, and 3000 but higher with GAA2.5 compared to GAA0 and GAA0.5. There was a quadratic ($P = 0.0033$) relationship between the doses of GAA and asymptotic total gas. A similar relationship was also exhibited at 48 hours of gas production. However, linear ($P = 0.0294$) and quadratic ($P = 0.0292$) relationships were observed in the total gas kinetics lag. However, a linear ($P = 0.0405$) relationship existed between GAA and CH_4. The inclusion of GAA at 2500 consistently had higher total gas CH_4, (mL/g DM) for a high concentrate diet than others (Fig. 1).

3.2. Ruminal CO and H_2S production and kinetics

The results of the effect of guanidinoacetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on ruminal CO and H_2S production and kinetics of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum is as shown in Table 3. The different treatments had no significant effect on all the parameters under consideration. However, a linear ($P = 0.0115$) relationship existed between CO (ml/g DM) with the inclusion of GAA at 24 hours. The inclusion of GAA at 2500 consistently had higher CO and H_2S (mL/g DM) for a high-concentrate diet than others (Fig. 1).

3.3. Ruminal fermentation profile

The results of the effect of GAA at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on ruminal fermentation profile and CH_4 conversion efficiency of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum is presented in Table 4. Although the inclusion of GAA had no significant effect on the ruminal fermentation profile in this study, there was a linear ($P = 0.0196$) relationship between GAA and DMD.

3.4. Dry matter digestibility and degradability

Table 5 presents the results of the effect of guanidinoacetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg

Table 2
Effect of guanidino acetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on ruminal total gas and CH_4 production and kinetics of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum.

		Doses of GAA, mg/kg DM							SEM[b]	*P* value	
Item		0	500	1000	1500	2000	2500	3000		Linear	Quadratic
Total gas kinetics[a]	*b*	322.30	316.75	296.58	283.25	282.60	288.38	325.60	12.16	0.3553	0.0033
	c	0.033	0.033	0.033	0.030	0.033	0.035	0.030	0.002	0.8307	0.9017
	Lag	3.56	3.21	3.36	3.38	3.45	3.62	3.78	0.128	0.0294	0.0292
Gas production (mL/g DM)	6 h	19.54^{a,b}	23.58^{a}	19.82^{a,b}	19.09^{a,b}	17.34^{b}	18.69^{a,b}	20.26^{a,b}	1.116	0.1023	0.2850
	24 h	163.58	159.54	153.56	152.57	146.08	160.59	166.96	7.969	0.9112	0.0629
	48 h	244.64	239.37	223.38	217.86	213.86	226.45	247.27	9.547	0.5921	0.0047
CH_4 kinetics[a]	*b*	27.58	36.40	32.66	46.41	34.13	67.14	45.92	10.98	0.2456	0.7519
	c	0.11^{b}	0.11^{b}	0.13^{a,b}	0.13^{a,b}	0.13^{a,b}	0.15^{a}	0.13^{a,b}	0.006	0.0528	0.6503
	Lag	14.03	13.89	13.45	14.12	13.50	14.18	13.93	0.311	0.8544	0.1196
CH_4 production (mL/g DM)	6 h	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.24	0.104	0.2046	0.4673
	24 h	3.27	3.55	3.81	3.64	4.45	5.36	3.78	0.636	0.1079	0.4974
	48 h	27.52	36.33	32.73	46.42	34.15	67.22	45.97	10.972	0.0605	0.8537
CH_4 (mL CH_4/100 mL gas)	6 h	0.00	0.00	0.00	0.17	0.00	0.00	0.25	0.114	0.2325	0.5840
	24 h	2.63	3.13	2.50	3.00	2.88	3.13	2.88	0.334	0.5348	0.8412
	48 h	12.29	15.38	14.92	18.25	14.21	21.13	19.71	2.767	0.0405	0.9884

[a] *b* = asymptotic total gas or CH_4 production (mL/g DM); *c* = rate of total gas or CH_4 production (mL/hour); *Lag* = initial delay before total gas or CH_4 production begins (hour).
[b] SEM = standard error of the mean.

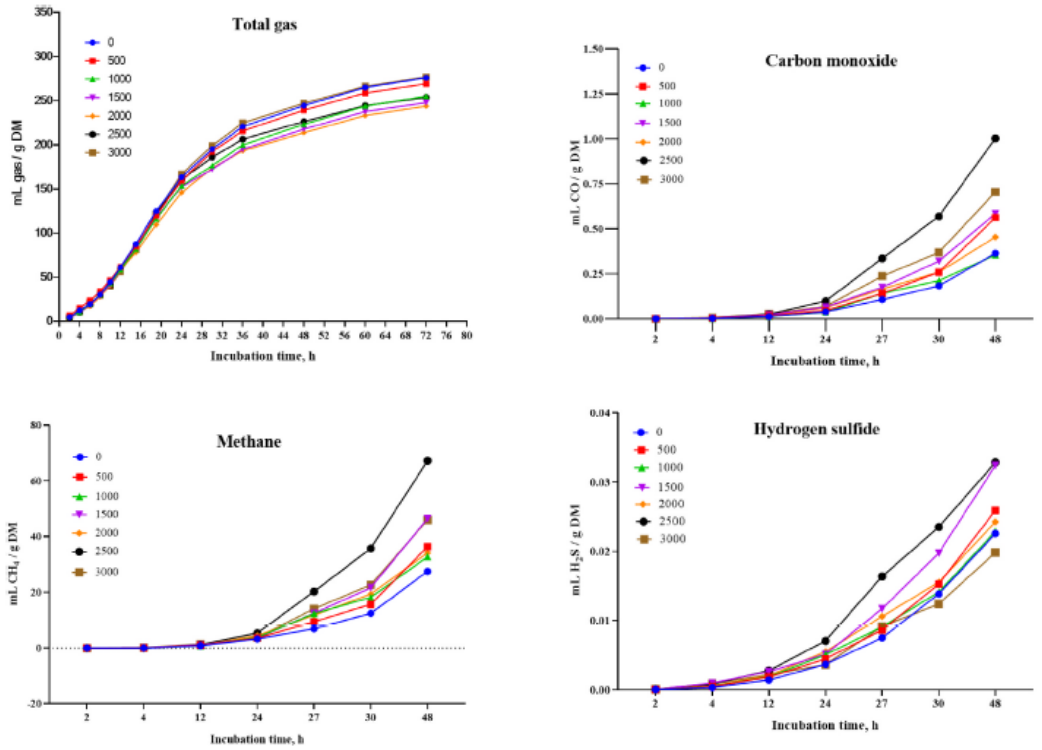


Fig. 1. Ruminal total gas production, methane, carbon monoxide, and hydrogen sulfide production (mL/g DM) of high concentrate diet with different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) using ruminal contents of sheep as a source of inoculum.

Table 3
Effect of guanidino acetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on ruminal CO and H_2S production and kinetics of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum.

		Dosis of GAA, mg/kg DM							SEM[b]	*P* value	
Item		0	500	1000	1500	2000	2500	3000		Linear	Quadratic
CO kinetics[a]	*b*	0.01	1.22	1.25	0.52	0.01	2.67	3.29	0.986	0.0688	0.1969
	c	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0013	0.1558	0.1709
	Lag	5.37	6.77	6.03	6.33	4.40	7.65	6.68	1.123	0.5066	0.7319
CO (mL/g DM)	6 h	0.002	0.003	0.003	0.004	0.003	0.003	0.007	0.002	0.1050	0.4512
	24 h	0.04	0.05	0.04	0.07	0.06	0.10	0.07	0.014	0.0115	0.8356
	48 h	0.36	0.56	0.36	0.59	0.45	1.00	0.71	0.202	0.0826	0.7596
H_2S kinetics[a]	*b*	0.01	0.01	0.17	0.02	0.01	0.02	0.01	0.059	0.7071	0.3719
	c	0.000	0.000	0.000	0.007	0.007	0.000	0.000	0.004	0.7289	0.1750
	Lag	7.84	8.27	4.76	5.75	5.40	7.34	6.69	1.719	0.6138	0.2442
H_2S (mL/g DM)	6 h	0.0003	0.0005	0.0005	0.0006	0.0006	0.0008	0.0009	0.0003	0.1536	0.7758
	24 h	0.004	0.004	0.005	0.005	0.006	0.007	0.004	0.001	0.4337	0.2144
	48 h	0.023	0.026	0.023	0.032	0.024	0.033	0.020	0.007	0.8555	0.3871

[a] *b* = asymptotic CO or H_2S production (mL/g DM); *c* = rate of CO or H_2S production (mL/h); *Lag* = initial delay before CO or H_2S production begins (hour).
[b] SEM = standard error of the mean.

GAA/kg dietary DM) on ruminal fermentation profile and CH_4 conversion efficiency of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum. The inclusion of GAA did not significantly affect the apparent digestibility and degradability kinetics of DM under consideration, except for D12. At D12, similar values were obtained for GAA0, GAA0.5, GAA1, GAA1.5, and GAA2, except that the value obtained for GAA2 was significantly higher than those of GAA2.5 and GAA3.

Table 4
Effect of guanidinoacetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on ruminal fermentation profile of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum.

	Dosis of GAA, mg/kg diet							SEM[b]	*P* value	
Item	0	500	1000	1500	2000	2500	3000		Linear	Quadratic
Fermentation profile										
pH	7.11	7.20	7.16	7.30	7.15	7.17	7.21	0.031	0.8034	0.6309
DMD	85.42	85.56	85.52	86.32	85.53	85.81	86.36	0.248	0.0196	0.8224
DOM	55.62	54.78	53.54	53.54	52.05	55.05	56.33	1.631	0.3939	0.0629
SCFA	3.85	3.75	3.61	3.59	3.43	3.78	3.93	0.190	0.9112	0.0629
ME	9.47	9.34	9.15	9.12	8.92	9.37	9.57	0.250	0.9139	0.0647

[a] pH = ruminal pH; DMD = dry matter degradability (%); DOM = digestible organic matter (%); SCFA = short-chain fatty acids (mmol/g DM); ME = the metabolizable energy (MJ/kg DM 24 hours).
[b] SEM = standard error of the mean.

Table 5
Effect of guanidinoacetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on apparent digestibility and degradability kinetics of dry matter (DM) at different hours of incubation of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum.

	Dosis of GAA, mg/kgDM								*P* value	
Item	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	SEM[a]	Linear	Quadratic
Digestibility (D), % DM										
D06	36.22	34.23	35.97	34.83	38.11	38.35	36.53	1.280	0.1170	0.8533
D12	47.18[a,b]	46.05[a,b]	46.72[a,b]	45.96[a,b]	48.30[a]	45.14[b]	45.27[b]	0.605	0.0839	0.2521
D24	59.42	65.23	58.39	62.92	59.71	64.42	64.48	1.899	0.1609	0.4503
D48	78.66	78.91	74.61	78.90	79.08	79.27	77.74	1.145	0.6956	0.6205
Degradability kinetics[b]										
a	24.08	25.00	24.82	24.03	24.70	25.34	23.97	0.899	0.9627	0.5936
b	70.72	70.68	62.33	72.36	70.11	69.66	66.85	3.981	0.7850	0.9772
a+*b*	94.81	95.67	87.15	96.39	94.82	95.01	90.82	4.526	0.8177	0.9371
c	0.03	0.03	0.04	0.03	0.03	0.04	0.04	0.004	0.4011	0.8700
DE*b*	29.34	29.17	28.76	29.54	29.35	29.42	29.44	0.941	0.7857	0.8722

[a] SEM = standard error of the mean.
[b] *a* = soluble and completely degradable DM (g/100 g DM), *b* = insoluble fraction but potentially degradable DM (g/100 g substrate), *a*+*b* = is the DM potentially degradable (g/100 g DM), *c* = the rate constant for the degradation of *b* fraction (%/hour), DE*b* = effective degradability of the *b* fraction (g/100 g DM).

3.5. Crude protein digestibility and degradability

The effect of GAA at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on apparent digestibility and degradability kinetics of crude protein (CP) at different hours of incubation of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum is as shown on Table 6. On D06, the inclusion of GAA at 0, 500,1000, 1500, 2000, and 3000 had similar effects, except that GAA at 2500 was significantly higher than the value obtained for 0 and 1500 inclusions. The inclusion of GAA at 2000 mg was higher than that at 3000 compared to others at D12. At D48, GAA at 500 mg had higher crude protein digestibility than others. The soluble and completely degradable crude protein was similar with GAA inclusion at 0, 500, 1000, 2000, 2500, and 3000, except that GAA1.5 was significantly lower than GAA0, GAA2, and GAA2.5. A significant quadratic relationship was observed between protein digestibility at 12 hours and the inclusion of GAA, where the dose that maximized digestibility was 1437.13 mg/kg. A quadratic relationship existed between the soluble and completely

Table 6
Effect of guanidinoacetic acid (GAA) at different levels (0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 mg GAA/kg dietary DM) on apparent digestibility and degradability kinetics of crude protein (CP) at different hours of incubation of high concentrate diet using ruminal contents of sheep as a source of inoculum.

	Doses of GAA, mg/kg DM								P-value	
Variables	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	SEM[a]	Linear	Quadratic
Digestibility (D), % crude protein										
D06	40.84[b]	42.14[a,b]	41.96[a,b]	38.34[b]	44.06[a,b]	47.37[a]	42.76[a,b]	1.187	0.0112	0.5527
D12	49.08[a,b]	50.72[a,b]	51.42[a,b]	51.88[a,b]	53.19[a]	49.78[a,b]	48.2[b]	1.001	0.6141	0.0019
D24	56.32	63.00	55.86	65.70	58.22	62.94	67.06	2.792	0.0352	0.6495
D48	75.94[cd]	99.86[a]	67.81[d]	83.05[bc]	90.33[b]	89.41[b]	79.16[c]	1.711	0.2339	0.0671
Degradability kinetics[b]										
a	34.25[a]	30.37[a,b]	28.76a[b]	26.57[b]	34.92[a]	34.38[a]	32.76[a,b]	1.307	0.183	0.007
b	60.71[a]	66.57[a]	45.10[b]	62.28[a]	62.24[a]	59.69[a]	58.51[a,b]	2.970	0.840	0.374
a+*b*	94.96[a]	96.95[a]	73.86[b]	88.84[a,b]	97.16[a]	94.06[a]	91.27[a]	3.433	0.727	0.066
c	0.03[a,b]	0.03[a,b]	0.06[a]	0.04[a,b]	0.02[b]	0.02[b]	0.03[a,b]	0.006	0.446	0.112
DE*b*	25.19[a,b]	28.14[a]	23.09[b]	28.93[a]	26.28[a,b]	26.12[a,b]	24.77[a,b]	0.956	0.604	0.133

[a] SEM = standard error of the mean.
[b] *a* = soluble and completely degradable CP (g/100 g CP), *b* = insoluble fraction but potentially degradable CP (g/100 g substrate), *a*+*b* = is the CP potentially degradable (g/100 g CP), *c* = the rate constant for the degradation of *b* fraction (%/hour), DE*b* = effective degradability of the *b* fraction (g/100 g CP).

degradable crude protein and GAA inclusion with the dose of GAA that minimized the protein degradation situated in 1305.56 mg/kg. The insoluble fraction but potentially degradable CP for GAA1 was lower than other inclusions except for GAA3, which was similar. The GAA1 and GAA1.5 had similar values, except that GAA1 had potentially degradable CP significantly lower than others. The rate constant for the degradation of the insoluble fraction but potentially degradable crude protein was significantly higher ($P < 0.05$) with GAA1 compared to GAA2 and GAA2.5. The effective degradation of the insoluble fraction but potentially degradable CP was significantly lower with the inclusion of GAA at 1000 compared with inclusion at 500 and 1500.

4. Discussion

4.1. Ruminal total gas and CH_4 production kinetics

Total gas production and the rate of gas production have been noted as benchmarks to measure the degradability of feed and the functionality and adaptability of microbial communities to substrate diets [43]. After the 6 hours of fermentation, the increase in the total gas production with GAA0.5 inclusion in the diet than at a higher dose (2000) could be attributed to the stimulatory effect of the bioactive compounds of GAA on the microbial communities at that dose, which increased microbial access and degradation of the feed compared to an inhibitory effect with an increase in dosage and its attendant decreased microbial access and feed degradation. This agrees with the findings of Alvarado-Ramírez et al. [44], which reported that a higher GAA dosage decreased total gas production, production rate of gas production, and asymptotic gas. The mechanism behind the decreased gas production is attributed to the proportion of short-chain fatty acids (SCFA) that GAA favours, which is propionate, and this occasioned the lowered gas production in comparison to that from acetate and butyrate [45,46]. The lower dose (GAA0.5) effect could also be attributed to the fact that GAA might have increased the activity of fibrinolytic enzymes, alpha-amylase, and protease [45], as well as the populations of microbial communities that favoured degradations of the substrate and in turn elicited high gas production.

Lower CH_4 generation by GAA0.5 implied increased feed degradation efficiency, considering that this was accompanied by increased gas production and, by extension, feed degradation. This means the amount of energy that could have been lost in the form of CH_4 could be channeled for productive purposes with a reduced impact on the environment. The high CH_4 production rate adduced to the higher additive dose (GAA2.5) could be because of creating an environment that favoured the quick adhesion and colonization of the substrate by methanogens [47]. This implies the stimulation of the CH_4-producing microbes, resulting in an increased rate of CH_4 generation by increased GAA dosage.

The quadratic relationship between doses of GAA and asymptotic total gas agrees with those of the Agricultural Research Council [44], which reported that adding GAA to the diet elicited a decrease in the asymptotic production of GP. With the increase in GAA doses, there was a subsequent decrease in the asymptotic values, except at GAA, which was 2500 and 3000 mg. A similar trend was seen at 48 hours of gas production, where an increase in GAA doses decreased gas production. The reason for this could be that GAA at higher doses perhaps does not favour enzymatic activity and increase in the populations of fibrolytic bacteria hence the lowering of gas volumes at 48 hours [26].

This study's *lag* phase of total gas kinetics showed linearity with GAA doses. There was an increase in the lag phase as the dosage of GAA increased. This effect can be attributed to the time that ruminal microorganisms are required to adapt to the presence of GAA, as it is susceptible to degradability when not rumen-protected, and it could be a source of nutrients (energy and nitrogen) for microbes to synthesize their proteins [45]. However, a quadratic relationship in the *lag* also played out with increased GAA doses, eliciting a decrease in adhesion and colonization of substrates. This infers that the low doses had a stimulatory effect on the microbes, allowing them to quickly adapt to the diet and elicit a rapid fermentation process.

The high production of CH_4 with the inclusion of GAA at 2500 can be attributed to the higher total gas production that was observed since feeds that present high total gas production generally also show a higher production of gas CH_4 [43]. In addition, it is possible that this dose of GAA caused an inhibitory effect on sulfur-reducing bacteria, and apparently this metabolic pathway could not function as an alternate H_2 sink [26].

4.2. Ruminal CO and H_2S production and kinetics

Several factors are noted to influence CO production, among which are microbial activity and the fermentative capacity of the ruminal microbe communities, as the type of degraded nutritive constituents [44]. Carbon monoxide has been described as an intermediate product of DM degradation; hence its production is associated with incomplete feed degradation or lower microbial activity in the rumen [48]. However, GAA inclusion barely influenced the CO and H_2S production of carbohydrate digestion of the substrate.

The linear relationship showed that with an increase in GAA doses, CO production increased, and this agrees with the report Vazquez-Mendoza et al. [26]. From our findings, it appears the production of CO at GAA2.5 was positively related to the production of CH_4, which may show that methanogens maintained a synergy with other microorganisms that produce CO, since, in the presence of water, acetogens, and methanogens oxidize CO to form CO_2 and H_2 and subsequently produce CH_4 [49,50]. Increased GAA inclusion numerically increased H_2S production with increased inclusion of GAA at 6 hours, and it appears that the inclusion of GAA caused an inhibitory effect or an unfavorable environment for the activity of Sulfur sulfur-reducing bacteria [26]. The dose at 2500 of GAA appeared to have elicited higher values for CO and H_2S, which implies that the dose had a stimulatory role on the microbial communities that influenced gas production.

4.3. Ruminal fermentation profile

An increase in the dosages of GAA increased DMD, and this agrees with the findings of Vazquez-Mendoza et al. [26]. It has been reported that the inclusion of GAA in the diet increases the rumen microbial population and the degradability of substrate nutrients [22,51,52] through its stimulatory effect.

The pH of this study was in the range of 7.11–7.30, which was alkaline hence the reason for the low production of H_2S could suffice. The production of H_2S has been noted to require an acidic rumen environment, preferably with a pH range of 5.5–6.5 [53].

4.4. Dry matter digestibility and degradability

It has been reported that in beef cattle, the addition of 0.03–0.40 % (on a DM basis) GAA in the diet increases daily weight gain and dry matter digestibility [22,51]. Moreover, the inconsistent DM digestibility observed in this study was likely related to enhanced enzyme activities and bacterial populations [52] also, GAA addition at an appropriate concentration improves fiber digestibility [24], which could have been responsible for higher digestibility on D12 with GAA2 compared to GAA2.5 and GAA3.

4.5. Crude protein digestibility and degradability

The increase in CP digestibility of GAA2.5 at D06 compared to the control and GAA1.5 could be attributed to the direct impact of the bioactive compound of GAA on the feed within the time frame. This is consistent with Li et al. [22] who reported that higher GAA inclusion resulted in higher CP digestibility with a linear relationship between the digestibility of CP and other nutrients with increased additions of GAA.

The altered response of CP digestibility was indicative that CP degradation in the rumen was stimulated by dietary GAA supplementation [54].

Adding higher doses of GAA across the digestibility (D06 – D48) did not explicitly show better results, which may be related to methyl donor limitation [54] as there appears to be an inversely proportional relationship between GAA inclusion and CP digestibility with time. As the CP digestibility increases, the dose level reduces with increased incubation duration. As observed at D06, GAA2.5 had better digestibility, but with increased incubation duration (from D12 to D48), it improved with reduced inclusion levels (GAA2 to GAA0.5). The increased digestibility on D06 by GAA2.5 could be attributed to the initial stimulatory effect of the sufficiently dosed bioactive components of GAA on the microbial community within a short time, which may become toxic with increased duration of incubation. In contrast, the increased digestibility at D48 by GAA0.5 was more effective in the long run due to a more sustainable stimulatory effect.

Soluble protein is assumed to be immediately available for utilization by rumen microbes and chemically defined as protein fractions dissolved in a borate phosphate buffer [55]. Insoluble and potentially degradable protein is not as immediately available for utilization as soluble protein but is fractionally degraded with time. Not all potentially degradable proteins may be rumen-degraded due to lignin-bound proteins, passage rates, and feeding management [56]. The higher rate constant could be attributed to rapid degradability [57] caused by the stimulatory effects of the additive at that dosage [58]. Moreover, the dosage might have created an environment that favoured the adhesion and colonization of the insoluble fraction but potentially degradable CP by microbes thereby increasing the rate constant [49]. The rate and extent of protein degradability of different feed ingredients varies considerably with protein source and animal species, which ultimately determines the incorporation of feed ingredients in the diets of ruminants [59]. It is suggested that there should be enough soluble, readily fermentable protein to support microbial growth and fermentation in the rumen for optimum utilization of roughages and a source of less fermentable protein, which can pass directly to the abomasum and small intestine for a normal proteolytic digestion and absorption process for optimal performance in high-producing ruminants [56].

From the preceding, it can be inferred that the varied results obtained for the degradability kinetics could be attributed to the stimulatory role or otherwise of the varied level of GAA inclusion on the microbial community, effect on feed, and the duration of incubation.

5. Conclusions

This study examined the effects of GAA supplementation on *in vitro* ruminal fermentation, greenhouse gas production, and crude protein (CP) digestibility in fattened sheep. GAA0.5 improved total gas production without significantly increasing CH_4 emissions, while higher doses increased CH_4, CO, and H_2S production. GAA's impact on CP digestibility varied with incubation time. The longer the duration of incubation (6–48 hours), the lower the dosage of GAA required for increased CP digestibility. GAA1 exhibited the highest rate constant for the insoluble but potentially degradable CP fraction degradation. These findings suggest that GAA can modulate ruminal protein degradation kinetics, potentially improving protein utilization efficiency in sheep. However, the *in vitro* nature of this study limits its generalizability. Future research should focus on *in vivo* validation, long-term effects on rumen microbial populations, and interactions with different dietary protein sources. While GAA shows promise for enhancing ruminal fermentation and protein degradation at lower doses, its application in ruminant nutrition requires careful consideration to balance benefits against increased greenhouse gas emissions and optimize protein utilization across different ruminal digestion time points.

CRediT authorship contribution statement

Oscar Vicente Vazquez-Mendoza: Writing – original draft, Validation, Formal analysis, Conceptualization. **Mona M.M.Y. Elghandour:** Investigation and data validation. **Maria A. Mariezcurrena Berasain:** Investigation and data validation. **Udoh A. Inyang:** Wring the draft. **Akaninyene Jack:** Wring the draft. **Maximilian Lackner:** Writing – review & editing. **Abdelfattah Z.M. Salem:** Supervision, Funding acquisition, data validation, Writing – review & editing.

Ethical statement

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal's author guidelines page, have been adhered to, and the appropriate ethical review committee approval has been received. The authors confirm that they have followed local and EU standards for the protection of animals used for scientific purposes.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

[1] B.N. Bergman, Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species, Physiol. Rev. 70 (1990), https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567.
[2] D.N. Kamra, Rumen microbial ecosystem, Curr. Sci. 89 (2005) 124–135.
[3] A.K. Patra, J. Saxena, The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production, Nutr. Res. Rev. 22 (2009) 204–219, https://doi.org/10.1017/S0954422409990163.
[4] E. Storm, E.R. Orskov, The nutritive value of rumen micro-organisms in ruminants. 1. Large-scale isolation and chemical composition of rumen micro-organisms, Br. J. Nutr. 50 (1983).
[5] C.S. Stewart, H.J. Flint, M.P. Bryant, The rumen bacteria, in: P.N.C.S. Hobson, Stewart (Eds.), The Rumen Microbial Ecosystem, Springer Netherlands, Dordrecht, 1997, pp. 10–72, https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_2.
[6] K. Paul, J.O. Nonoh, L. Mikulski, A. Brune, "Methanoplasmatales," thermoplasmatales-related archaea in termite guts and other environments, are the seventh order of methanogens, Appl. Environ. Microbiol. 78 (2012) 8245–8253, https://doi.org/10.1128/AEM.02193-12.
[7] M. Poulsen, C. Schwab, B. Borg Jensen, R.M. Engberg, A. Spang, N. Canibe, O. Højberg, G. Milinovich, L. Fragner, C. Schleper, W. Weckwerth, P. Lund, A. Schramm, T. Urich, Methylotrophic methanogenic Thermoplasmata implicated in reduced methane emissions from bovine rumen, Nat. Commun. 4 (2013) 1428, https://doi.org/10.1038/ncomms2432.
[8] K.A. Johnson, D.E. Johnson, Methane emissions from cattle, J. Anim. Sci. 73 (1995) 2483–2492, https://doi.org/10.2527/1995.7382483x.
[9] G. Tadesse, Rumen manipulation for enhanced feed utilization and improved productivity performance of ruminants: a review, Momona Ethiopian Journal of Science 6 (2014) 3, https://doi.org/10.4314/mejs.v6i2.109618.
[10] F. Hassan, M.A. Arshad, H.M. Ebeid, M.S. Rehman, M.S. Khan, S. Shahid, C. Yang, Phytogenic additives can modulate rumen microbiome to mediate fermentation kinetics and methanogenesis through exploiting diet-microbe interaction, Front. Vet. Sci. 7 (2020), https://doi.org/10.3389/fvets.2020.575801.
[11] S.A. Huws, C.J. Creevey, L.B. Oyama, I. Mizrahi, S.E. Denman, M. Popova, R. Muñoz-Tamayo, E. Forano, S.M. Waters, M. Hess, I. Tapio, H. Smidt, S. J. Krizsan, D.R. Yáñez-Ruiz, A. Belanche, L. Guan, R.J. Gruninger, T.A. McAllister, C.J. Newbold, R. Roehe, R.J. Dewhurst, T.J. Snelling, M. Watson, G. Suen, E. H. Hart, A.H. Kingston-Smith, N.D. Scollan, R.M. do Prado, E.J. Pilau, H. C. Mantovani, G.T. Attwood, J.E. Edwards, N.R. McEwan, S. Morrisson, O. L. Mayorga, C. Elliott, D.P. Morgavi, Addressing global ruminant agricultural challenges through understanding the rumen microbiome: past, present, and future, Front. Microbiol. 9 (2018), https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02161.
[12] M. Soliman, Effect of feed additives on methane production, rumen fermentation, and milk yield in dairy cows, Global Journal of Animal Science, Livestock Production and Animal Breeding 10 (2022), https://doi.org/10.35841/2408-5499.22.10.173, 001–009.
[13] A.N. Hristov, J. Oh, C. Lee, R. Meinen, F. Montes, T. Ott, J. Firkins, A. Rotz, C. Dell, A. Adesogan, W. Yang, J. Tricarico, E. Kebreab, G. Waghorn, J. Dijkstra, S. Oosting, Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: a review of

technical options for non-CO_2 emissions, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2013) Rome https://www.fao.org/4/i3288e/i3288e00.htm. (Accessed 20 September 2024), ISBN 978-92-5-107659-0.
[14] E.E. Connor, Invited review: improving feed efficiency in dairy production: challenges and possibilities, Animal 9 (2015) 395–408, https://doi.org/10.1017/S1751731114002997.
[15] K.J. Hart, D.R. Yáñez-Ruiz, S.M. Duval, N.R. McEwan, C.J. Newbold, Plant extracts to manipulate rumen fermentation, Anim. Feed Sci. Technol. 147 (2008) 8–35, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.007.
[16] S.M. Ostojic, Tackling guanidinoacetic acid for advanced cellular bioenergetics, Nutrition 34 (2017) 55–57, https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.09.010.
[17] S.M. Ostojic, Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid, Eur. J. Nutr. 54 (2015) 1211–1215, https://doi.org/10.1007/s00394-015-1050-7.
[18] H.F. Speer, K.A. Pearl, E.C. Titgemeyer, Relative bioavailability of guanidinoacetic acid delivered ruminally or abomasally to cattle, J. Anim. Sci. 98 (2020) 1–6, https://doi.org/10.1093/jas/skaa282.
[19] EFSA, Safety and efficacy of guanidinoacetic acid for chickens for fattening, breeder hens and roosters, and pigs, EFSA J. 14 (2016), https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4394.
[20] D.T. He, X.R. Gai, L.B. Yang, J.T. Li, W.Q. Lai, X.L. Sun, L.Y. Zhang, Effects of guanidinoacetic acid on growth performance, creatine and energy metabolism, and carcass characteristics in growing-finishing pigs1, J. Anim. Sci. 96 (2018) 3264–3273, https://doi.org/10.1093/jas/sky186.
[21] C. Liu, C. Wang, J. Zhang, Q. Liu, G. Guo, W.J. Huo, C.X. Pei, L. Chen, Y.L. Zhang, Guanidinoacetic acid and betaine supplementation have positive effects on growth performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Angus bulls, Anim. Feed Sci. Technol. 276 (2021), https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114923.
[22] S.Y. Li, C. Wang, Z.Z. Wu, Q. Liu, G. Guo, W.J. Huo, J. Zhang, L. Chen, Y.L. Zhang, C.X. Pei, S.L. Zhang, Effects of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion, rumen fermentation and blood metabolites in Angus bulls, Animal 14 (2020) 2535–2542, https://doi.org/10.1017/S1751731120001603.
[23] W. Li, Z. Cui, Y. Jiang, A. Aisilkaer, Q. Wu, F. Zhang, W. Wang, Y. Bo, H. Yang, Dietary guanidine acetic acid improves ruminal antioxidant capacity and alters rumen fermentation and microflora in rapid-growing lambs, Antioxidants 12 (2023) 772, https://doi.org/10.3390/antiox12030772.
[24] C. Dong, M. Wei, J. Ju, L. Du, R. Zhang, M. Xiao, Y. Zheng, H. Bao, M. Bao, Effects of guanidinoacetic acid on in vitro rumen fermentation and microflora structure and predicted gene function, Front. Microbiol. 14 (2024), https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285466.
[25] W.-J. Li, F. Zhang, S.-T. Pei, S.-S. He, F.-L. Xiong, L.-K. Lv, H.-J. Yang, The effect of guanidinoacetic acid addition on in vitro rumen fermentation characteristics and gas production of early- and late-stage sheep-fattening diets, Fermentation 9 (2023) 549, https://doi.org/10.3390/fermentation9060549.
[26] O.V. Vazquez-Mendoza, V. Andrade-Yucailla, M.M.M.Y. Elghandour, D. A. Masaquiza-Moposita, J.A. Cayetano-De-Jesús, E.R. Alvarado-Ramírez, M. J. Adegbeye, M. Barroo-Rodríguez, A.Z.M. Salem, Effect of dietary guanidinoacetic acid levels on the mitigation of greenhouse gas production and the rumen fermentation profile of alfalfa-based diets, Animals 13 (2023) 1719, https://doi.org/10.3390/ani13111719.
[27] C. Wang, H. Liu, C. Wang, J. Liu, H. Liu, Effects of dietary rumen-protected betaine on lactation performance and serum metabolites of mid-lactation holstein dairy cows, J. Agric. Food Chem. 68 (2020) 13154–13159, https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07453.
[28] National Research Council, Nutrient Requirements of Small Ruminants, National Academies Press, Washington, D.C., 2007, https://doi.org/10.17226/11654.
[29] AOAC, Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, Sixteenth, AOAC, Arlington, VA, USA, 1997.
[30] P.J. Van Soest, J.B. Robertson, B.A. Lewis, Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition, J. Dairy Sci. 74 (1991) 3583–3597, https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
[31] K.H. Menke, H. Steingass, Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid, Animal Research and Development 28 (1988) 7–55.
[32] M.K. Theodorou, B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan, J. France, A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds, Anim. Feed Sci. Technol. 48 (1994) 185–197, https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6.
[33] R.M. Mauricio, P.L. Mould, M.S. Dhanoa, E. Owen, K.S. Channa, M.K. Theodorou, A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation, Anim. Feed Sci. Technol. 79 (1999) 321–330, https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4.
[34] H.K. Goering, P.J. Van Soest, Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agricultural Research Service, USDA, USA, 1970.
[35] F. Tagliapietra, M. Cattani, H.H. Hansen, I.K. Hindrichsen, L. Bailoni, S. Schiavon, Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48h in situ NDF digestibility and on in vitro 24h gas production methods, Anim. Feed Sci. Technol. 170 (2011) 182–191, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.09.008.
[36] SAS Institute Inc, SAS/STAT® 9.4 User's Guide, 2012.
[37] J. France, M.S. Dhanoa, M.K. Theodorou, S.J. Lister, D.R. Davies, D. Isac, A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds, J. Theor. Biol. 163 (1993) 99–111, https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1109.
[38] G. Getachew, G.M. Crovetto, M. Fondevila, U. Krishnamoorthy, B. Singh, M. Spanghero, H. Steingass, P.H. Robinson, M.M. Kailas, Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds, Anim. Feed Sci. Technol. 102 (2002) 169–180, https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00212-2.
[39] K.H. Menke, L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, W. Schneider, The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro, J. Agric. Sci. 93 (1979) 217–222, https://doi.org/10.1017/S0021859600063048.
[40] E.R. Ørskov, I. McDonald, The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage, J. Agric. Sci. 92 (1979) 499–503, https://doi.org/10.1017/S0021859600063048.
[41] S. Tassone, R. Fortina, P.G. Peiretti, In vitro techniques using the DaisyII incubator for the assessment of digestibility: a review, Animals 10 (2020) 775, https://doi.org/10.3390/ani10050775.
[42] C.H.J. Correa, Estimación de la degradabilidad efectiva en el rumen mediante métodos numéricos, Rev. Colombiana Ciencias Pecuarias 22 (2009) 19–24. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023521004.
[43] T.O. Faniyi, M.K. Adewumi, A.A. Jack, M.J. Adegbeye, M.M.M.Y. Elghandour, A. Barbabosa- Pliego, A.Z.M. Salem, Extracts of herbs and spices as feed additives mitigate ruminal methane production and improve fermentation characteristics in West African Dwarf sheep, Trop. Anim. Health Prod. 53 (2021) 312, https://doi.org/10.1007/s11250-021-02751-x.
[44] E.R. Alvarado-Ramírez, A. Maggiolino, M.M.M.Y. Elghandour, M.A. Rivas-Jacobo, G. Ballesteros-Rodea, P. De Palo, A.Z.M. Salem, Impact of Co-ensiling of maize with moringa oleifera on the production of greenhouse gases and the characteristics of fermentation in ruminants, Animals 13 (2023) 764, https://doi.org/10.3390/ani13040764.
[45] G.D. Ren, X.Y. Hao, X.Z. Zhang, S. Liu, H.X. Zhang, G.Y. Tian, J.X. Zhang, Effects of guanidinoacetic acid and betaine supplementation on growth performance, rumen fermentation and blood metabolites in lambs, Sci. Agric. Sin. 56 (2023) 766–778, https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2023.04.014.
[46] E. Sucu, Effects of microalgae species on *in vitro* rumen fermentation pattern and methane production, Ann. Anim. Sci. 20 (2020) 207–218, https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0061.
[47] T. Chen, B. Wang, R.C. Power, H. Jiang, The first archaeobotanical evidence of Medicago sativa L. in China: hay fodder for livestock, Archaeol Anthropol Sci 12 (2020) 2, https://doi.org/10.1007/s12520-019-00957-7.
[48] Y. Zhao, A.S. Wexler, F. Hase, Y. Pan, F.M. Mitloehner, Carbon monoxide emissions from corn silage, J. Environ. Protect. 12 (2021) 438–453, https://doi.org/10.4236/jep.2021.127027.
[49] S.W. Ragsdale, Life with carbon monoxide, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 39 (2004) 165–195, https://doi.org/10.1080/10409230490496577.
[50] S.M. Techtmann, A.S. Colman, F.T. Robb, "That which does not kill us only makes us stronger": the role of carbon monoxide in thermophilic microbial consortia: minireview, Environ. Microbiol. 11 (2009), https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01865.x.
[51] Z. Li, H. Liang, J. Xin, L. Xu, M. Li, H. Yu, W. Zhang, Y. Ge, Y. Li, M. Qu, Effects of dietary guanidinoacetic acid on the feed efficiency, blood measures, and meat quality of jinjiang bulls, Front. Vet. Sci. 8 (2021), https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684295.
[52] Y. Liu, J. Zhang, C. Wang, G. Guo, W. Huo, C. Xia, L. Chen, Y. Zhang, C. Pei, Q. Liu, Effects of guanidinoacetic acid supplementation on lactation performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Holstein dairy cows, J. Sci. Food Agric. 103 (2023) 1522–1529, https://doi.org/10.1002/jsfa.12249.
[53] H.H.P. Fang, H. Liu, Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture, Bioresour. Technol. 82 (2002) 87–93, https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00110-9.
[54] S. Yi, S. Hu, J. Wang, A. Abudukelimu, Y. Wang, X. Li, H. Wu, Q. Meng, Z. Zhou, Effect of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance, rumen fermentation, blood indices, nutrient digestion, and nitrogen metabolism in angus steers, Animals 14 (2024) 401, https://doi.org/10.3390/ani14030401.
[55] C.J. Sniffen, J.D. O'Connor, P.J. Van Soest, D.G. Fox, J.B. Russell, A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability, J. Anim. Sci. 70 (1992) 3562–3577, https://doi.org/10.2527/1992.70113562x.
[56] S. Tamminga, Protein degradation in the forestomachs of ruminants, J. Anim. Sci. 49 (1979) 1615–1630, https://doi.org/10.2527/jas1979.4961615x.
[57] M.M.M.Y. Elghandour, A. Maggiolino, E.R. Alvarado-Ramírez, J. Hernández-Meléndez, R.R. Rivas-Caceres, P.E. Hernandez-Ruiz, A. Khusro, P. De Palo, A.Z. M. Salem, Marine microalgae as a nutritive tool to mitigate ruminal greenhouse gas production: in vitro fermentation characteristics of fresh and ensiled maize (Zea mays L.) forage, Vet Sci 10 (2023) 556, https://doi.org/10.3390/vetsci10090556.
[58] X. Tsounis, J. Vulevic, G.G.C. Kuhnle, T. George, J. Leonczak, G.R. Gibson, C. Kwik-Uribe, J.P.E. Spencer, Flavanol monomer-induced changes to the human faecal microflora, Br. J. Nutr. 99 (2008), https://doi.org/10.1017/S0007114507853384.
[59] A. Bach, S. Calsamiglia, M.D. Stern, Nitrogen metabolism in the rumen, J. Dairy Sci. 88 (2005) E9–E21, https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7.

7.3 Estudio *in vivo*: Efectos del ácido guanidinoacético sobre el desempeño productivo, bioquímica sérica y calidad de la canal y carne en corderos cruzados en fase de finalización

Oscar Vicente Vazquez-Mendoza [a], Mona M.M.Y. Elghandour [a], Maria A. Mariezcurrena Berasain [a], Daniel López-Aguirre [b], Maria Angelica Ortiz-Heredia [c], Bárcena Gama Ricardo [c], Abdelfattah Z.M. Salem [a], *

[a] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50295 Toluca, Estado de México, México. Email: osvam2009@gmail.com

[b] Universidad Autónoma de Tamaulipas. Facultad de Ingeniería y Ciencias. Centro Universitario Adolfo López Mateos. Edificio Centro de Gestión del Conocimiento, 4° piso. Ciudad Victoria, Tamaulipas. C.P. 87149. México. Email: dlaguirre@uat.edu.mx

[c] Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco 56230, México. Email: heidi_1607@hotmail.com

Resumen

El ácido guanidinoacético (AGA), precursor natural de creatina, se ha posicionado como aditivo alimentario estratégico para corderos en finalización por su rol en el metabolismo energético y la fermentación ruminal. Este estudio evaluó los efectos dosis-respuesta de AGA (0, 1000, 1500, 2000 mg/kg MS) durante 56 días en parámetros productivos, calidad de canal, atributos de carne y bioquímica sérica en corderos Suffolk × Dorset (21.9 ± 4.4 kg). La suplementación no afectó significativamente la ganancia diaria (345 a 363 g/d) ni el consumo (1.19 kg/d), pero indujo patrones cuadráticos en índice de conversión (3.26–3.60; P = 0.04) y eficiencia alimenticia (0.29–0.32; P = 0.05). Se registraron reducciones lineales en grasa visceral (2.65 a 1.60; P = 0.01) y colágeno intramuscular (-15.8%; P = 0.010),

mejorando la terneza (-35.3% en fuerza de corte; P = 0.007). El dimorfismo sexual fue crítico: machos mostraron +14% de eficiencia alimenticia (P = 0.006) y desarrollo magro, mientras hembras presentaron mayor contenido graso y retención de cloro (+1.79 mmol/L; P = 0.015). Bioquímicamente, el AGA mantuvo parámetros séricos estables, con efecto cuadrático en cloro (P = 0.041), sin comprometer función hepatorrenal. Económicamente, la tendencia cuadrática en utilidad bruta (P = 0.074) se asoció a mejoras numéricas en rendimiento de canal y peso caliente, más que a reducción física de grasa. Se concluye que el AGA optimiza la calidad sensorial mediante modulación de colágeno y redistribución lipídica, con seguridad metabólica hasta 2000 mg/kg MS. Su viabilidad económica requiere estrategias sexo-específicas y valoración comercial basada en atributos cualitativos para mercados premium.

Palabras clave: Creatina, suavidad de la carne, composición tisular, dimorfismo sexual, eficiencia.

Abstract

Guanidinoacetic acid (GAA), a natural creatine precursor, has been established as a strategic feed additive for finishing lambs due to its role in energy metabolism and ruminal fermentation. This study evaluated dose-response effects of GAA (0, 1000, 1500, 2000 mg/kg DM) over 56 days on productive parameters, carcass traits, meat attributes, and serum biochemistry in Suffolk × Dorset lambs (initial weight: 21.9 ± 4.4 kg). Supplementation did not significantly affect average daily gain (345–363 g/d) or feed intake (1.19 kg/d) but induced quadratic patterns in feed conversion ratio (3.26 to 3.60; P = 0.04) and feed efficiency (0.29 to 0.32; P = 0.05). Linear reductions occurred in visceral fat (2.65 to 1.60; P = 0.01) and intramuscular collagen (-15.8%; P = 0.010), improving tenderness (-24.8% to -35.3% Warner-Bratzler shear force; P = 0.007). Sexual dimorphism was critical: males exhibited +14% feed efficiency (P = 0.006) and lean development, while females showed higher fat content and chloride retention (+1.79 mmol/L; P = 0.015). Biochemically, GAA maintained stable serum parameters with a quadratic chloride effect (P = 0.041), without compromising

hepatorenal function. Economically, the quadratic gross utility trend (P = 0.074) linked to numerical improvements in carcass yield and hot carcass weight rather than physical fat reduction. We conclude that GAA enhances sensory quality through collagen modulation and lipid redistribution, demonstrating metabolic safety up to 2000 mg/kg DM. Optimal economic viability requires sex-specific strategies and market valuation prioritizing qualitative attributes for premium markets.

Keywords: creatine, meat tenderness, tissue composition, sexual dimorphism, feed efficiency.

7.4 Introducción

La industria ovina mundial enfrenta una presión creciente para mejorar la productividad y la calidad de la carne, al tiempo que responde a las demandas de los consumidores por productos magros y ricos en nutrientes. En regiones como México, los sistemas de producción de pequeños rumiantes enfrentan desafíos significativos que incluyen la degradación de pastizales, la volatilidad de los costos de alimentación y la necesidad de prácticas sostenibles para optimizar la eficiencia de los recursos (Chávez-Espinoza et al., 2022). El ácido guanidinoacético (AGA), un precursor de la creatina ha surgido como un aditivo alimentario prometedor debido a su papel en el metabolismo energético y la síntesis de proteínas mediante la estimulación de la síntesis de fosfocreatina, lo cual apoya la regeneración de ATP y la homeostasis energética celular (Jin et al., 2024; Ostojic, 2015). El AGA es sintetizado en riñón e hígado a partir de arginina y glicina, y requiere una metilación por la S-adenosilmetionina para formar creatina (Wyss & Kaddurah-Daouk, 2000). proceso crítico en especies con alta demanda energética muscular. Sin embargo, su aplicación en rumiantes enfrenta desafíos por la degradación ruminal (~49% de escape; Speer et al., 2020) y efectos variables en ácidos grasos volátiles (Speer et al., 2022). En bovinos, la suplementación con AGA mejora el rendimiento productivo, reduce la grasa dorsal y modula la bioquímica sérica mediante optimización del metabolismo energético (Eckhardt et al., 2024; S. Y. Li et al., 2020). Estudios recientes en novillos destacan que el AGA regula positivamente genes

asociados a hipertrofia muscular (IGF-1, cadenas pesadas de miosina) y mejora la eficiencia energética, aunque sin alterar características de la canal (Eckhardt et al., 2024). Ardalan et al. (2020) demostraron que el AGA puede modular la suavidad de la carne mediante la reducción del colágeno intramuscular, lo que respalda su potencial para mejorar atributos sensoriales clave.

En ovinos, la suplementación con AGA en rangos de 500 a 1,500 mg/kg de materia seca ha demostrado mejoras en la ganancia diaria de peso, fermentación ruminal y capacidad antioxidante sérica, así como reducciones en el grosor de la grasa dorsal y las pérdidas por goteo en la carne (Jin et al., 2024; W. Li et al., 2023; Ren et al., 2022; S. Zhang et al., 2025). Jin et al. (2024) reportaron que dosis de 750 a 1,000 mg/kg incrementaron el diámetro de las fibras musculares y regularon positivamente la expresión de acetil-CoA carboxilasa en ovejas Hu, sugiriendo una mejora en el metabolismo lipídico. De forma similar, S. Zhang et al. (2022) observaron que 1,500 mg/kg de AGA aumentaron el flujo de nutrientes duodenales y los niveles de insulina en corderos Kazakh, promoviendo el crecimiento.

A pesar de estos hallazgos, persisten vacíos de investigación cruciales, particularmente concernientes a la dosis óptima para corderos cruzados en finalización con dietas altas en almidón y su impacto sobre las características de la canal, composición química y calidad de la carne, además de la bioquímica sanguínea en respuestas dosis-dependientes. Este estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos dosis-respuesta de la suplementación con AGA (0, 1,000, 1,500 y 2,000 mg/kg MS) sobre el desempeño productivo, la bioquímica sérica, la calidad de la canal y carne, y el análisis económico en corderos cruzados en finalización. Nuestra hipótesis fue que los niveles incrementales de AGA mejorarían linealmente el rendimiento de crecimiento, las características de la canal y optimizarían la calidad de la carne mediante la modulación del metabolismo energético y la deposición proteica y lipídica. Los resultados proporcionarán conocimientos aplicables para formular dietas costo-efectivas y avanzar en sistemas sostenibles de producción ovina.

7.5 Materiales y Métodos

7.5.1 Diseño experimental y suplementación dietética

El estudio recibió aprobación institucional y se condujo de acuerdo con las regulaciones para el cuidado y uso de animales para investigación del Colegio de Postgraduados y la NOM-062-ZOO-1999 (SAGARPA, 2001) así como las directrices del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Docencia, Investigación, Servicio y Producción (CICUAL-DISP-CA 2023) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Se utilizaron cuarenta corderos cruzados Suffolk × Dorset sanos (50% machos y 50% hembras), de dos meses de edad (peso corporal = 21.9 ± 4.4 kg), en un ensayo de finalización de 56 días. Todos los animales utilizados en este estudio nacieron y se criaron en la granja experimental del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. La ubicación geográfica es 19° 28′ 4.26″ N, 98° 53′ 42.18″ O, a una altitud de 2,250 m sobre el nivel del mar, con una temperatura media anual de 15.2°C (García, 2004). El estudio se realizó en estas instalaciones.

Los corderos fueron trasladados a un corral común y alimentados con heno de alfalfa durante 3 días, posteriormente se asignaron a corrales individuales (1.5 m × 2 m) con pisos de concreto y cama de aserrín. Cada corral fue equipado con un comedero individual y acceso a un balde con agua limpia y fresca. Los corderos fueron desparasitados con 1 mL por 50 kg de peso corporal de Ivermectina subcutánea (Ivomec® F, Boehringer Ingelheim, Jalisco, México), inyectados con 2 mL de una mezcla de vitaminas A, D y E por animal (Vigantol® ADE Fuerte, Elanco Salud Animal, Jalisco, México) y vacunados con 2.5 mL por animal de una bacterina anti-clostridial (Ultrabact® 7, Zoetis, Ciudad de México, México) antes del inicio del experimento.

Posteriormente, los corderos fueron asignados aleatoriamente a uno de 4 grupos experimentales en un diseño completamente al azar, utilizando el peso corporal inicial como covariable. Cada tratamiento se replicó diez veces. Los corderos fueron alimentados con una dieta basal complementada con 0 (AGA0), 1000 (AGA1), 1500 (AGA1.5) y 2000 (AGA2) mg de AGA por kg de materia seca de la dieta. Los animales experimentaron un período de adaptación de 5 días a sus dietas con AGA. La dieta basal fue formulada para cubrir los requerimientos nutricionales de corderos en crecimiento y obtener una ganancia diaria promedio de peso (GDP) de 350 g/d (National Research Council, 2007). La composición de las dietas experimentales y los niveles nutricionales se muestran en la Cuadro 4.

Cuadro 4. Composición y perfil nutricional de las dietas experimentales

	Nivel de ácido guanidinoacético, mg/kg MS			
Ingredientes, % MS	0	1000	1500	2000
Paja de trigo	14.50	14.50	14.50	14.50
Maíz molido	49.10	49.10	49.10	49.10
Salvado de trigo	15.00	15.00	15.00	15.00
Harina de soya	12.75	12.75	12.75	12.75
Melaza de caña	6.00	6.00	6.00	6.00
Premezcla de vitaminas y minerales[Z]	2.00	2.00	2.00	2.00
Metionina protegida[Y]	0.10	0.10	0.10	0.10
Lisina protegida[X]	0.20	0.20	0.20	0.20
Carbonato de calcio	0.35	0.25	0.20	0.15
Ácido guanidinoacético	0.00	0.10	0.15	0.20

Nutrientes, % MS[V]				
Proteína cruda	15.28	16.11	16.83	16.92
Extracto etéreo	3.44	3.23	2.90	2.91
Cenizas	8.15	7.79	7.92	7.82
Fibra cruda	10.15	10.02	9.37	9.94
Fibra detergente neutro	25.84	26.61	24.88	26.20
Fibra detergente ácido	11.59	11.52	10.26	10.89
Almidón	37.59	39.85	41.00	40.22
Azúcar	6.43	6.01	5.63	5.92
Fosforo	0.50	0.51	0.54	0.53
Energía bruta (MJ/kg MS)	17.60	17.68	17.63	17.65

[Z]La premezcla de vitaminas y minerales proporciona lo siguiente por kg: 240 g Ca; 30 g P; 20 g Mg; 80 g Na; 120 g Cl; 5 g K; 5 g S; 5 mg Cr; 4000 mg Mn; 2000 mg Fe; 5000 mg Zn; 100 mg I; 30 mg Se; 60 mg Co; 500000 UI vitamina A; 150000 UI vitamina D; 1000 UI vitamina E.

[Y]Mepron® es una fuente de metionina protegida a nivel ruminal con concentración del 85% (Evonik Operations GmbH, Alemania).

[X]Ajipro®-L es una fuente de lisina protegida a nivel ruminal con concentración del 40% (Ajinomoto Health & Nutrition North America, Inc. Illinois, EUA).

[V]Medición de nutrientes por NIRs con calibración AMINONIR® Feeds (Evonik Operations GmbH, Alemania) expresados como porcentaje de la materia seca.

La fuente de AGA (GuanAMINO®, Evonik Operations GmbH, Alemania) utilizado contenía 96% de AGA y 4% almidón de maíz. Las dosis empleadas en este estudio se determinaron con base en un estudio previo *in vitro* (Vazquez-Mendoza et al., 2024) y otras investigaciones publicadas en corderos en finalización (J. H. Zhang et al., 2022; S. Zhang et al., 2022) considerando un escape ruminal del 49% (Speer et al., 2020). Las dietas experimentales se proporcionaron a cada grupo de corderos como una ración totalmente mezclada (RTM) con el AGA incorporado en la RTM para asegurar la entrega precisa en relación con el consumo de alimento.

7.5.2 Manejo de la alimentación

Los corderos fueron alimentados *ad libitum* dos veces al día a las 08:00 y 15:00, proporcionando el 60% del consumo estimado de alimento en la mañana y el 40% en la tarde. Se suministró agua fresca que fue reemplazada diariamente para cada cordero. El consumo de alimento se registró diariamente, y los residuos de alimento del día anterior de cada grupo de tratamiento fueron recolectados y pesados cada mañana antes de la alimentación. Con base en estos datos, el alimento ofrecido se incrementó en un 10% para asegurar el consumo voluntario.

7.5.3 Desempeño productivo

Durante toda la fase experimental, el consumo de alimento se registró diariamente utilizando una báscula digital Torrey® (modelo SXE, Fabricantes de Equipos para Refrigeración, Nuevo León, México). Los corderos fueron pesados utilizando una báscula electrónica colgante alimentada por batería (Truper®; BASE-300C, Truper, México) en los días 0, 14, 28, 42 y 56. Con estos datos se calcularon para cada cordero el consumo diario promedio de alimento, la ganancia diaria promedio de peso corporal, la relación alimento/ganancia y la eficiencia alimenticia (ganancia/alimento).

7.5.4 Muestreo y análisis de alimentos

Se recolectaron muestras de cada dieta experimental al inicio y final del ensayo de alimentación, las cuales fueron secadas a 65°C durante 48 horas en una estufa de aire forzado y posteriormente molidas en un molino Wiley (Thomas Wiley® Laboratory Mill modelo 4, Swedesboro, NJ, EUA) con un tamiz de 1 mm y almacenadas en bolsas de plástico para la determinación de la composición química mediante espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) utilizando un espectrofotómetro (FT-NIR TANGO®, Bruker Optik GmbH, Alemania) equipado con curvas de calibración para alimentos terminados de rumiantes (AMINONIR® Feeds, Evonik Operations GmbH, Alemania) para la determinación de materia seca, cenizas, proteína cruda (contenido de N multiplicado por 6.25), extracto etéreo, fibra

cruda, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, almidón, azúcar, fósforo y energía bruta. Todas las calibraciones están basadas en métodos oficiales (AOAC, 1997; Van Soest et al., 1991).

7.5.5 Recolección y análisis de suero sanguíneo

En el día 50 del experimento se recolectaron muestras de sangre mediante punción venosa yugular de 28 corderos en ayuno (12 h, agua *ad libitum*) (3 hembras y 4 machos por grupo) utilizando tubos BD Vacutainer® SST™ con activadores de coágulo (Becton Dickinson, NJ, EUA). Después de la coagulación a 25°C durante 40 min, el suero se separó por centrifugación a 2,000 × g (15 min, 4°C), se extrajo el plasma y se almacenó a −20°C. Los parámetros bioquímicos como glucosa, nitrógeno ureico en sangre (NUS), creatinina, bilirrubina total, AST (aspartato aminotransferasa), CK (creatina quinasa), GLDH (glutamato deshidrogenasa), proteínas totales, albúmina, globulinas, calcio, fósforo, sodio, potasio, cloruro, bicarbonato, brecha aniónica y osmolalidad, fueron analizados utilizando un equipo espectrofotómetro Dirui CS-T240 UV-Vis (Dirui Industrial Co., Ltd., Changchun, Jilin, China) y reactivos dcL-SEKISUI (SEKISUI Diagnostics LLC, Burlington, EUA). La glucosa se obtuvo vía glucosa oxidasa (500 nm; SEKISUI Glucose-SL), BUN por ureasa-salicilato (670 nm; SEKISUI Urea Nitrogen), creatinina vía picrato alcalino (510 nm), proteínas totales vía método de Biuret (540 nm), y electrolitos (Na^+, K^+, Cl^-) por potenciometría directa. La precisión intraensayo (CV <5%) se validó mediante mediciones por triplicado, y las muestras hemolizadas se excluyeron utilizando el sensor óptico del analizador (absorbancia >0.3 a 540 nm). Los parámetros derivados (brecha aniónica: $Na^+ + K^+ - Cl^- - HCO_3^-$; osmolalidad: $2[Na^+]$ + glucosa/18 + NUS/2.8) se calcularon post-análisis utilizando fórmulas establecidas (Stockman & Scott, 2008). Los intervalos de referencia para glucosa (2.8–4.0 mmol/L), NUS (37.28–40.67 mg/dL) y brecha aniónica (9–31 mmol/L) se alinearon con rangos específicos de la especie (Frye et al., 2022).

7.5.6 Medición de las características de la canal

En el día 60 del estudio, veinticuatro animales (6 corderos/tratamiento: cuatro machos y dos hembras) con ayuno de 12 horas fueron transportados 5 km a un matadero comercial. Los corderos fueron pesados a su llegada al corral de descanso en el matadero y posteriormente sacrificados siguiendo las directrices nacionales de bienestar animal (SAGARPA, 2015) y las directrices CICUAL-DISP. La canal caliente de cada cordero fue pesada utilizando una báscula electrónica colgante alimentada por batería Truper® (BASE-300C, Truper, México) y enviada a un enfriador (24 h).

Las mediciones individuales para cada canal fueron: peso de canal caliente (PCC), grosor de grasa entre la 12ª y 13ª costilla usando un calibrador digital (Calibrador Vernier, Truper, México), el área del ojo de la costilla (AOC) se midió realizando un corte entre la 12ª y 13ª costilla, trazando el área del músculo *Longissimus lumborum* en una hoja de acetato y posteriormente midiendo el área con un planímetro digital (Planix, Tamaya Technics Inc., Tokio, Japón). El porcentaje de grasa renal, pélvica y cardíaca (RPC) se calificó en una escala de 1 a 3 (Colomer-Rocher et al., 1988), mientras que la puntuación de marmoleo se determinó visualmente según estándares fotográficos en una escala de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 (J. Wang et al., 2022).

El pH y la temperatura se midieron en tres áreas diferentes del músculo *Longissimus lumborum* a las 0 y 24 horas postmortem utilizando un medidor de pH portátil con compensación automática de temperatura (HANNA® instruments, HI 99163, EUA). Posteriormente, se tomó una muestra de 15 cm (300 g) de la mitad izquierda de la canal de cada animal, entre la 11ª y 13ª costilla del músculo *Longissimus lumborum*. Estas muestras fueron identificadas, divididas en dos porciones iguales, empaquetadas individualmente y congeladas inmediatamente a -10°C, almacenándose durante 15 días hasta su análisis.

7.5.7 Composición química de la carne

Se utilizó una muestra de ~100 g del músculo *Longissimus lumborum* para la medición de la composición química; previo al análisis, las muestras fueron

descongeladas a 4°C durante 24 h en una cámara refrigerada (Thermo Scientific®, Modelo 928), posteriormente homogeneizadas utilizando un molino de café BRAUN® (Modelo KSM2, 350 W; tamaño de partícula ≤ 1 mm). La composición química proximal (humedad, grasa, proteína, colágeno) se determinó utilizando un espectrómetro NIR FoodScan® (Foss, Dinamarca; rango 850–1050 nm) siguiendo el protocolo de estudio colaborativo para análisis de carne (Anderson et al., 2007). El modelo de calibración de red neuronal artificial (RNA), validado a través de un ensayo multilaboratorio (Anderson et al., 2007), demostró alta precisión para la cuantificación de humedad (EEP = 0.72%), proteína (EEP = 0.62%) y grasa (EEP = 0.78%), consistente con las aplicaciones NIR en análisis de calidad de carne (Prieto et al., 2009). El contenido de colágeno se derivó utilizando regresión de mínimos cuadrados parciales (AOAC, 2016).

7.5.8 Medición del color de la carne

Submuestras del músculo *Longissimus lumborum* en rebanadas de 25 mm de grosor se descongelaron a 4°C durante 24 h en una cámara refrigerada, y posteriormente se midió la evolución del color de la carne utilizando el sistema de color L*, a*, b* (CIE; Luminosidad, L*; rojez, a*; amarillez, b*) con un espectrofotómetro (DS-200, Hangzhou CHNSpec Technology Co., Ltd, Hangzhou, China). Después de 24 horas de descongelación, se cortó una capa delgada de cada muestra y se tomó la medición inicial del color (tiempo 0) en tres ubicaciones de la superficie. Las mediciones de color se realizaron posteriormente a las 24, 48 y 72 horas. Después de la primera medición, las muestras se mantuvieron a 3°C y se empaquetaron en una bandeja de plástico envuelta con película de PVC permeable al oxígeno (Sañudo et al., 2000).

7.5.9 Análisis de pérdidas por cocción y fuerza de corte Warner-Bratzler

Filetes de 5 cm de grosor del músculo *Longissimus lumborum* previamente almacenados fueron descongelados a 4°C durante 24 h, las muestras fueron pesadas y posteriormente cocidas en un horno de convección (Hamilton Beach,

Virginia, EUA) hasta alcanzar una temperatura interna de 70°C para determinar las pérdidas por cocción y la fuerza de corte Warner-Bratzler (WBSF). La temperatura fue monitoreada utilizando un termómetro digital (FlashCheck®, Deltatrak International México, Jalisco, México). Después de alcanzar la temperatura interna objetivo, los filetes fueron retirados del horno, se dejaron reposar durante 2 min y posteriormente fueron repesados. Los filetes fueron colocados en una bandeja de acero inoxidable, cubiertos con película de film plástico y almacenados a 3°C durante 5 horas. Después de este tiempo, se extrajeron seis cilindros de 1.3 cm de diámetro de cada filete paralelos a las fibras musculares. Los cilindros fueron posteriormente cortados individualmente perpendicular a las fibras musculares utilizando un equipo de medición de fuerza (Force One® FDIX, Wagner Instruments, Connecticut, EUA) equipado con una cuchilla Warner-Bratzler en forma de V. El promedio de 3 cilindros fue utilizado para el análisis estadístico (AMSA, 2016; Sañudo et al., 2000). Las pérdidas por cocción fueron determinadas utilizando la siguiente ecuación:

$$[1 - ((peso\ crudo - peso\ cocido))/(peso\ crudo)].$$

7.5.10 Pérdidas por goteo y capacidad de retención de agua

Las pérdidas por goteo se midieron en una muestra rectangular del músculo *Longissimus lumborum* de ~20 g que fue descongelada durante 24 h a 4°C, se registró el peso inicial, y luego la submuestra fue suspendida de un clip en una bolsa de plástico con cierre de alambre para recolectar el goteo de agua durante 24, 48 y 72 h a 3°C. Después de las tres mediciones, las muestras fueron retiradas de las bolsas y pesadas para determinar el peso final. Las pérdidas por goteo se determinaron utilizando la siguiente ecuación (Fevold et al., 2024) :

$$[1 - (peso\ inicial - peso\ final)/(peso\ inicial)]$$

La capacidad de retención de agua (CRA) de las muestras preparadas se evaluó adoptando el método de prensado con papel filtro (Szmańko et al., 2021). El contenido de agua del papel filtro Whatman No.1 se estandarizó antes de la adición

de la muestra secándolo a 105°C hasta peso constante. En este caso utilizamos una porción de carne de 3 g que fue colocada sobre la placa de vidrio y el papel filtro Whatman No.1, cubierta con un cubreobjetos de 24 × 24 mm, y cargada con un bloque de metal de 2 kg durante 5 min. El valor de CRA se expresó como el porcentaje de agua retenida en la muestra (a pesar de la carga de peso) respecto al contenido de agua de la muestra antes de la carga (100%) (Szmańko et al., 2021).

7.5.11 Análisis económico

El análisis económico incorporó los costos de materia prima en México al mes de mayo de 2024. La moneda elegida para este análisis fue el dólar americano (USD) y los precios en pesos mexicano fueron transformados a dólares de acuerdo con el tipo de cambio del diario oficial de la federación el 15 de mayo de 2024. Los costos en base húmeda de las dietas experimentales AGA0, AGA1, AGA1.5 y AGA2 fueron 0.349, 0.357, 0.360 y 0.364 USD/kg, respectivamente. El costo total de alimentación se calculó multiplicando estos costos de dieta por el consumo en base húmeda para cada tratamiento. Los costos operacionales fijos se estandarizaron en 52.94 USD/cordero para todos los tratamientos de acuerdo con el salario mínimo de la zona centro de México para el año 2024. El precio de compra de los corderos se estableció en 4.67 USD/kg de peso vivo, mientras que el precio de venta de las canales fue de 11.98 USD/kg en la zona de Texcoco, estado de México. Basándose en estos parámetros, se calculó la ganancia por cordero para cada nivel de tratamiento con AGA.

7.5.12 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar para la asignación de unidades experimentales (corderos). Los datos sobre desempeño productivo, características de la canal y carne, y bioquímica sanguínea fueron inicialmente analizados para evaluar la normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Bartlett. Los datos se analizaron utilizando el procedimiento GLM en el software SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). El peso

corporal inicial (PCI) se utilizó como covariable para el rendimiento de crecimiento y las características de la canal; cuando la covariable PCI no fue significativa, se eliminó del modelo. Los efectos del AGA sobre el desempeño, características de la canal y carne, bioquímica sanguínea y análisis económico se evaluaron según el siguiente modelo: $Yij = \mu + Ti + Sj + eij$ donde Yij = una observación en el tratamiento i y sexo j, μ = media general, Ti = efecto fijo de la dosis de GAA i, Sj = efecto fijo del sexo j, eij = error aleatorio con media 0 y varianza σ^2. Se utilizaron contrastes polinomiales ortogonales para determinar los efectos lineales y cuadráticos de las dosis crecientes de AGA dietético en las variables respuesta. Dado que las dosis de AGA no fueron equidistantes, se calcularon coeficientes apropiados para determinar los efectos lineales y cuadráticos utilizando el procedimiento IML de SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). Los resultados ordinales (RPC y marmoleo) se analizaron mediante modelos logit acumulativos utilizando el procedimiento LOGISTIC de SAS 9.4 (SAS Institute Inc., 2012). También se realizó la prueba post hoc de Tukey. El nivel de significancia se estableció 0.05. Por lo tanto, un valor $P < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo, mientras que valores P entre 0.05 y 0.10 se interpretaron como tendencias.

7.6 Resultados

Desempeño productivo:

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de desempeño productivo de corderos alimentados con dieta complementadas con AGA. La suplementación con AGA no afectó significativamente los parámetros básicos de crecimiento, registrándose promedios generales de 21.89 kg peso inicial (P = 0.98), 41.79 kg peso final (P = 0.58), 355.21 g/d ganancia diaria promedio (P = 0.83) y 1.19 kg/d consumo de alimento (P = 0.43). Sin embargo, pero reveló un patrón cuadrático en el índice de conversión alimenticia (P = 0.04) y eficiencia alimenticia (P = 0.05), con un óptimo teórico estimado en ~853 mg/kg de MS. No obstante, este modelo explica solo el 6% de la variabilidad ($R^2 = 0.06$), y los datos experimentales mostraron mejores valores de ICA en los extremos (0 y 2000 mg/kg).

Cuadro 5. Comportamiento productivo de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Nivel de AGA mg/kg de MS[Z]					Valor de *P*		
Variables[Y]	0	1000	1500	2000	EQ	AGA	L	Q
N	10	10	10	10				
Peso inicial, kg	22.09 ± 1.46	21.47 ± 1.46	21.7 ± 1.46	22.29 ± 1.46	Y = 21.89	0.98	0.96	0.66
Peso final, kg	42.39 ± 0.87	41.70 ± 0.87	40.82 ± 0.87	42.25 ± 0.87	Y = 41.79	0.58	0.63	0.33
GDP, g/d	363.15 ± 14.29	354.12 ± 14.30	345.04 ± 14.29	358.51 ± 14.30	Y = 355.21	0.83	0.65	0.53
CADP, kg/d	1.16 ± 0.04	1.25 ± 0.04	1.21 ± 0.04	1.16 ± 0.04	Y=1.19	0.43	0.86	0.11
ICA, kg:kg	3.26 ± 0.14	3.60 ± 0.14	3.51 ± 0.14	3.26 ± 0.14	Y1	0.21	0.80	0.04
EFA, kg:kg	0.31 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.32 ± 0.01	Y = 0.30	0.25	0.97	0.05

[Z]AGA=ácido guanidinoacético; MS= materia seca; todos los datos son presentados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar; L = efecto lineal de dosis de AGA; Q = efecto cuadrático de dosis de AGA; EQ= ecuaciones; Y1 = 3.27 + 0.0005 × AGA - 2.93E-07 × AGA^2 mg/kg MS (R^2 =0.06).

[Y]GDP=ganancia diaria promedio de peso; CADP=consumo de alimento diario promedio; ICA= índice de conversión alimenticia; EFA=eficiencia alimenticia.

En contraste, el sexo demostró un impacto determinante (Cuadro 6): los machos superaron a las hembras en peso final (+7.9%, P = 0.001), ganancia diaria de peso (+17%, P = 0.001) y eficiencia alimenticia (+14%, P = 0.006), mientras que las hembras tuvieron un índice de conversión 13.5% mayor (P = 0.004), evidenciando un dimorfismo sexual vinculado a diferencias metabólicas más que a consumo de alimento (P = 0.422).

Cuadro 6. Efecto por sexo del comportamiento productivo de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Sexo		
Variables[Z]	Macho	Hembra	Valor de *P*
n	20	20	
Peso inicial, kg	22.69 ± 1.03	21.09 ± 1.03	0.278
Peso final, kg	43.38 ± 0.62[a]	40.20 ± 0.62[b]	0.001
GDP, g/d	382.99 ± 10.19[a]	327.43 ± 10.19[b]	0.001
CADP, kg/d	1.21 ± 0.03	1.18 ± 0.03	0.422
ICA, kg:kg	3.19 ± 0.10[b]	3.62 ± 0.10[a]	0.004
EFA, kg:kg	0.32 ± 0.01[a]	0.28 ± 0.01[b]	0.006

[Z]GDP=ganancia diaria promedio de peso; CADP=consumo de alimento diario promedio; ICA= índice de conversión alimenticia; EFA=eficiencia alimenticia; todos los datos son las medias de mínimos cuadrados ± error estándar.

[ab]Medias en la misma fila con distinta literal son significativamente diferentes (P < 0.05)

Características de la canal

La suplementación con AGA no modifico (P > 0.05) las principales variables respuesta de las características de la canal como el peso al sacrificio, peso de la canal caliente o rendimiento (Cuadro 7), lo que sugiere que este aditivo no altera la productividad básica de la canal. Sin embargo, se observaron cambios específicos en la grasa visceral (RPC) que disminuyó linealmente con la dosis de AGA (P = 0.01), pasando de 2.65 a 1.60 en la escala de 1-3, lo que indica un efecto reductor de AGA en la acumulación de grasa no comercial. Además, el área del ojo de la costilla mostró un patrón cuadrático (P = 0.04), con un máximo teórico estimado en ~1020 mg/kg (ecuación Y2, R^2 = 0.20), sugiriendo que dosis medias podrían estimular levemente el desarrollo muscular, aunque con baja predictividad. El marmoleo, aunque no significativo, mostró una tendencia ascendente en dosis altas (1.71 a 2000 mg/kg vs 1.36 en control), posiblemente por redistribución de grasa desde vísceras hacia el músculo.

Cuadro 7. Características de la canal de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Nivel de AGA mg/kg de MS[Z]					Valor de *P*		
Variables[Y]	0	1000	1500	2000	EQ	AGA	L	Q
n	6	6	6	6				
PCS, kg	44.02 ± 1.25	43.37 ± 1.26	42.34 ± 1.26	43.45 ± 1.27	Y=43.98	0.81	0.58	0.61
PCC, kg	22.68 ± 0.85	21.63 ± 0.85	21.68 ± 0.85	22.51 ± 0.86	Y= 22.35	0.73	0.76	0.30
Rendimiento, %	51.48 ± 0.58	50.64 ± 0.58	50.98 ± 0.58	51.44 ± 0.59	Y=50.91	0.70	0.89	0.25
Grasa dorsal, mm	4.71 ± 0.54	5.34 ± 0.54	4.70 ± 0.54	4.62 ± 0.55	Y=4.68	0.77	0.84	0.41
Grasa en RPC, 1-3	2.65 ± 0.12	1.99 ± 0.17	1.80 ± 0.05	1.60 ± 0.15	Y1	0.06	0.01	0.66
Marmoleo, 1-5	1.36 ± 0.05	1.29 ± 0.05	1.81 ± 0.06	1.71 ± 0.06	Y=1.54	0.56	0.28	0.72
AOC, cm^2	23.55 ± 1.35	18.74 ± 0.36	21.29 ± 1.36	21.93 ± 1.37	Y2	0.12	0.42	0.04

[Z]AGA=ácido guanidinoacético; MS= materia seca; todos los datos son presentados como las medias de mínimos cuadrados ± el error estándar; L = efecto lineal de dosis de AGA; Q = efecto cuadrático de dosis de AGA; EQ=ecuaciones; Y1= 2.61 - 0.0005×AGA (R^2= 0.26); Y2=23.03385 - 0.00754×AGA + 3.69E-06×AGA2 (R^2=0.20).

[Y]PCS= peso corporal al sacrificio; PCC=peso de la canal caliente; RPC=riñón, pelvis y corazón; AOC=área del ojo de la costilla.

El sexo tuvo un impacto significativo sobre las características de la canal (Cuadro 8), donde los machos registraron mayor peso corporal al sacrificio (45.35 vs 41.24 kg, P = 0.006), pero menor rendimiento en canal (50.45% vs 51.82%, P = 0.038), lo que refleja su mayor desarrollo de tejidos no comerciales (huesos, órganos). Las hembras, en cambio, mostraron tendencia a mayor (P < 0.05) grasa dorsal (5.33 vs 4.35 mm) y marmoleo (1.72 vs 1.46), coherente con su fisiología orientada a reservas energéticas. La ausencia de diferencias en el área del ojo de la costilla (20.97 vs 21.79 cm², P = 0.577) indica que la ventaja en peso de los machos no se traduce en mayor hipertrofia muscular, sino en masa corporal global. Estos resultados subrayan cómo el sexo modula la partición de nutrientes, con machos priorizando crecimiento somático y hembras deposición lipídica, incluso bajo la misma suplementación con AGA.

Cuadro 8. Efecto de sexo sobre características de la canal corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Sexo		
Variables[Z]	Macho	Hembra	Valor de P
n	16	8	
PCS, kg	45.35 ± 0.76[a]	41.24 ± 1.08[b]	0.006
PCC, kg	22.79 ± 0.51	21.46 ± 0.73	0.155
Rendimiento, %	50.45 ± 0.35[b]	51.82 ± 50[a]	0.038
Grasa dorsal, mm	4.35 ± 0.33	5.33 ± 0.47	0.105
Grasa en RPC, 1-3	1.94 ± 0.12	2.22 ± 0.17	0.417
Marmoleo, 1-5	1.46 ± 0.05	1.72 ± 0.09	0.411
AOC, cm^2	20.97 ± 0.82	21.79 ± 1.16	0.577

[Z]PCS= peso corporal al sacrificio; PCC=peso de la canal caliente; RPC=riñón, pelvis y corazón; AOC=área del ojo de la costilla. Todos los datos son presentados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar.

[ab]Medias en la misma fila con distinta literal son significativamente diferentes (P < 0.05).

Calidad de la carne

La suplementación con AGA mejoró significativamente la calidad de la carne (Cuadro 9), reduciendo la fuerza de corte en 24.8-35.3% con 1000-1500 mg/kg (P = 0.007), con un óptimo teórico calculado en 1,285 mg/kg según la regresión cuadrática (R^2 = 0.43). Las pérdidas por goteo a 24, 48 y 72 h no mostraron

diferencias significativas (P > 0.05), evidenciando únicamente una tendencia numérica al aumento con 1000 mg/kg, mientras que la capacidad de retención de agua permaneció estable con una variación máxima de 4.4% entre tratamientos (P = 0.901), indicando que los efectos del AGA sobre la retención de agua fueron mínimos. El pH inicial mostró una tendencia al incremento del 5.7% con 1000 mg/kg (P = 0.056), aunque este efecto no persistió a las 24 h (P = 0.383), sugiriendo modificaciones transitorias en la acidificación muscular. En la composición química se observaron reducciones lineales significativas de 2.1% en cenizas (P = 0.016) y 15.8% en colágeno (P = 0.010), junto con una tendencia de incremento marginal del 3.3% en proteína (P = 0.058), mientras que el contenido graso permaneció inalterado (P = 0.188).

Cuadro 9. Calidad de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Nivel de AGA mg/kg de MS[Z]						Valor de P		
Variables[Y]	0	1000	1500	2000	EEM	EQ	AGA	L	Q
n	6	6	6	6					
Fuerza de corte, kgf	4.67[a]	3.02[b]	3.41[b]	3.51[ab]	0.31	Y1	0.007	0.010	0.015
Perdida por cocción, %	35.94	34.78	33.68	35.74	0.90	Y=35.04	0.284	0.510	0.141
pH 0	6.19[b]	6.54[a]	6.40[ab]	6.29[ab]	0.09	Y2	0.056	0.382	0.013
pH 24	5.62	5.55	5.48	5.49	0.06	Y=5.55	0.383	0.105	0.776
Perdida por goteo 24 h, %	8.24	9.63	8.83	9.79	0.77	Y=8.94	0.457	0.226	0.789
Perdida por goteo 48 h, %	17.26	20.69	17.64	17.98	1.38	Y=18.48	0.296	0.866	0.172
Perdida por goteo 72 h, %	26.97	31.01	25.34	26.37	1.92	Y=27.61	0.196	0.565	0.217
CRA, %	56.22	56.78	58.68	57.83	2.54	Y=57.75	0.901	0.549	0.923
Cenizas, %	73.23[a]	72.59[ab]	71.69[b]	72.25[ab]	0.310	Y1	0.016	0.008	0.260
Proteína, %	21.65	21.88	21.89	22.37	0.181	Y2	0.058	0.016	0.314
Grasa, %	3.59	3.64	4.27	3.32	0.199	Y = 3.62	0.188	0.987	0.199
Colágeno, %	1.46[a]	1.44[a]	1.37[ab]	1.23[b]	0.048	Y3	0.010	0.003	0.065

[Z]AGA=ácido guanidinoacético; MS= materia seca. EEM=error estándar de la media; L = efecto lineal de dosis de AGA; Q = efecto cuadrático de dosis de AGA; EQ=ecuaciones; Y1 = 4.67509 - 0.00236 × AGA + 9.1879E-7 × AGA^2 (R^2 = 0.43); Y2 = 6.19203 + 0.0005731 × AGA - 2.6985E-7 × AGA^2 (R^2 = 0.30); Y3 = 73.32 - 0.0006169 × AGA mg/kg (R^2 = 0.20); Y4 = 21.52 + 0.00032 × AGA mg/kg (R^2 = 0.25); Y5 = 1.52 - 0.000107 × AGA mg/kg (R^2 = 0.28).
[Y]N=newtons; CRA=capacidad de retención de agua.
[ab]Medias en la misma fila con distinta literal son significativamente diferentes (P < 0.05).

Estos resultados demuestran que el AGA mejora la suavidad de la carne principalmente mediante la reducción sustancial del tejido conectivo y la

optimización del contenido proteico, con impacto limitado en la capacidad de retención de agua y nulo efecto en la deposición lipídica, estableciendo un perfil de mejora centrado en los componentes estructurales del músculo.

El sexo influyó principalmente en parámetros de composición química de la carne (Cuadro 10), donde los machos presentaron 1.53% mayor humedad (P = 0.003) y 9.9% más colágeno (P = 0.025) que las hembras, diferencias que podrían asociarse a una textura ligeramente más firme en los machos. Las hembras mostraron tendencia a 1.79% mayor contenido proteico (P = 0.052), reflejando diferencias en la partición de nutrientes hacia síntesis proteica. Variables críticas de calidad sensorial como fuerza de corte, pérdidas por cocción y goteo, pH y capacidad de retención de agua no difirieron significativamente (P > 0.05), indicando que las características organolépticas primarias son equivalentes entre sexos.

Cuadro 10. Efecto de sexo sobre la calidad de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

Variables[Z]	Sexo		Valor de *P*
	Macho	Hembra	
n	16	12	
Fuerza de corte, kgf	3.77 ± 0.19	3.53 ± 0.26	0.483
Perdida por cocción, %	35.04 ± 0.54	35.04 ± 0.77	0.997
pH 0	6.33 ± 0.05	6.38 ± 0.08	0.663
pH 24	5.58 ± 0.04	5.49 ±0.05	0.189
Perdida por goteo 24 h, %	8.57 ± 0.47	9.67 ± 0.66	0.190
Perdida por goteo 48 h, %	18.65 ± 0.83	18.14 ± 1.18	0.730
Perdida por goteo 72 h, %	27.99 ± 1.16	26.86 ± 1.64	0.581
CRA, %	58.50 ± 1.53	56.25 ± 2.17	0.407
Humedad, %	72.99 ± 0.19[a]	71.89 ± 0.26[b]	0.003
Proteína, %	21.75 ± 0.15	22.14 ± 0.11	0.052
Grasa, %	3.46 ± 0.19	3.95 ± 0.26	0.140
Colágeno, %	1.44 ± 0.03[a]	1.31 ± 0.04[b]	0.025

[Z]CRA=Capacidad de retención de agua. Todos los datos se presentan como media de mínimos cuadrados ± error estándar.

Estos hallazgos demuestran que el dimorfismo sexual en la carne de cordero se manifiesta principalmente en aspectos composicionales (~10% más colágeno en machos, ~2% más proteína en hembras) más que en atributos sensoriales, lo que

sugiere que ambos sexos ofrecen calidad sensorial comparable para el consumidor, pero con perfiles nutricionales ligeramente diferenciados que podrían orientar estrategias de comercialización específicas.

Química sanguínea

La suplementación con AGA no mostró efectos significativos (P > 0.05) en la mayoría de los parámetros sanguíneos, incluyendo glucosa, nitrógeno ureico (NUS), enzimas hepáticas (AST, CK, GLDH), proteínas totales, electrolitos (calcio, fósforo, sodio, potasio) y osmolaridad (Cuadro 11).

Cuadro 11. Parámetros de química sanguínea de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Nivel de AGA mg/kg de MS[Z]						Valor de *P*		
Variables[Y]	0	1000	1500	2000	EEM	EQ	AGA	L	Q
N	7	7	7	7					
Glucosa, mmol/L	4.36	4.36	3.92	4.23	0.149	Y = 4.26	0.146	0.218	0.641
NUS, mmol/L	7.56	7.79	7.79	7.68	0.594	Y = 7.64	0.991	0.859	0.794
Creatinina, µmol/L	75.82	70.82	67.96	75.39	3.117	Y = 72.39	0.247	0.563	0.089
Bilirrubina, µmol/L	1.04	1.25	1.25	1.32	0.236	Y = 1.22	0.842	0.393	0.847
AST, U/L	92.76	84.90	94.19	100.48	5.174	Y = 93.75	0.232	0.290	0.096
CK, U/L	359.48	359.34	247.06	280.91	55.851	Y = 306.07	0.394	0.191	0.887
GLDH, U/L	36.88	52.24	37.31	33.88	9.517	Y = 40.77	0.531	0.758	0.229
Proteína total, g/L	62.99	61.42	62.13	63.71	1.117	Y = 62.43	0.507	0.764	0.143
Albumina, g/L	32.02	31.88	31.88	32.73	0.636	Y = 32.11	0.741	0.536	0.402
Globulinas, g/L	30.97	29.54	30.26	30.97	1.019	Y = 30.32	0.718	0.953	0.269
Calcio, mmol/L	2.51	2.52	2.54	2.60	0.064	Y = 2.54	0.751	0.361	0.571
Fosforo, mmol/L	3.31	3.61	3.07	2.98	0.250	Y = 3.23	0.314	0.278	0.242
Sodio, mmol/L	144.82	144.96	146.67	144.67	0.687	Y = 145.18	0.163	0.590	0.272
Potasio, mmol/L	5.06	5.17	5.09	5.31	0.140	Y = 5.14	0.570	0.294	0.660
Cloro, mmol/L	103.27	102.84	102.84	105.13	0.678	Y1	0.077	0.143	0.041
Bicarbonato, mmol/L	22.45	23.02	22.88	22.74	0.953	Y =22.75	0.977	0.811	0.720
Anión GAP, mmol/L	24.26	24.26	26.12	22.40	1.361	Y = 24.29	0.315	0.648	0.238
Osmolaridad, mOsm/kg	290.37	290.94	293.08	289.94	1.426	Y = 290.86	0.428	0.788	0.307

[Z]AGA = ácido guanidinoacético; MS = materia seca; U = unidad; EEM = error estándar de la media; L = efecto lineal de dosis de AGA; Q = efecto cuadrático de dosis de AGA; EQ =ecuaciones; Y1 = 103.20 -0.00249 × AGA +0.0000017 × AGA^2 (R^2 = 0.19).
[Y]NUS = nitrógeno ureico en sangre; AST = aspartato aminotransferasa; CK = creatina quinasa; GLDH = glutamato deshidrogenasa; anión GAP = (Sodio+Potasio) − (Cloruro+Bicarbonato).

Esto indica que el AGA no altero el metabolismo energético, la función hepática o el balance electrolítico en corderos en este estudio. La excepción fue el cloro, que presentó un efecto cuadrático significativo (P = 0.041, ecuación Y1: R^2 = 0.19), con niveles máximos a 2000 mg/kg (105.13 vs 102.84 mmol/L en dosis intermedias), sugiriendo una modulación leve y no lineal en la homeostasis de este ion. Parámetros como creatinina (P = 0.089) y AST (P = 0.096) mostraron tendencias cuadráticas no concluyentes, posiblemente vinculadas a variaciones individuales en el metabolismo muscular o renal. En conjunto, los resultados respaldan la seguridad metabólica del AGA en las dosis evaluadas.

Cuadro 12. Efecto de sexo sobre los parámetros de química sanguínea de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Sexo		
Variables[Z]	Macho	Hembra	Valor de *P*
n	16	12	
Glucosa, mmol/L	4.48 ± 0.10[a]	3.96 ± 0.11[b]	0.003
NUS, mmol/L	7.26 ± 0.39	8.15 ± 0.45	0.152
Creatinina, mmol/L	71.75 ± 2.06	73.25 ± 2.37	0.637
Bilirrubina, µmol/L	1.26 ± 0.16	1.67 ± 0.18	0.691
AST, U/L	97.75 ± 90.69	88.42 ± 3.94	0.087
CK, U/L	272.31 ± 36.85	351.08 ± 42.55	0.175
GLDH, U/L	44.91 ± 6.28	35.25 ± 7.25	0.325
Proteína total, g/L	62.63 ± 0.74	63.50 ± 0.85	0.109
Albumina, g/L	32.00 ± 0.42	32.25 ± 0.48	0.700
Globulinas, g/L	29.63 ± 0.67	31.25 ± 0.78	0.127
Calcio, mmol/L	2.54 ± 0.04	2.55 ± 0.05	0.780
Fosforo, mmol/L	3.15 ± 0.17	3.33 ± 0.19	0.476
Sodio, mmol/L	144.56 ± 0.45[b]	146.00 ± 0.52[a]	0.049
Potasio, mmol/L	5.06 ± 0.09	5.26 ± 0.11	0.165
Cloro, mmol/L	102.63 ± 0.45	104.42 ± 0.52	0.015
Bicarbonato, mmol/L	22.63 ± 0.63	22.92 ± 0.73	0.764
Anión GAP, mmol/L	24.44 ± 22.58	24.08 ± 1.04	0.799
Osmolaridad, mOsm/kg	289.50 ± 0.94[b]	292.67 ± 1.09[a]	0.038

[Z]NUS = nitrógeno ureico en sangre; AST = aspartato aminotransferasa; CK = creatina quinasa; GLDH = glutamato deshidrogenasa; anión GAP = (Sodio+Potasio) − (Cloruro+Bicarbonato). Todos los datos son presentados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar.
[ab]Medias en la misma fila con distinta literal son significativamente diferentes (P < 0.05).

Se observo un efecto significativo de sexo sobre los parámetros de química sanguínea (Cuadro 12). Donde los machos mostraron mayor glucosa sanguínea (4.48 vs 3.96 mmol/L, P = 0.003), reflejando diferencias en la movilización de energía, posiblemente asociadas a mayores demandas metabólicas por crecimiento muscular. Las hembras presentaron niveles elevados de sodio (+1.44 mmol/L, P = 0.049), cloro (+1.79 mmol/L, P = 0.015) y osmolaridad plasmática (+3.17 mOsm/kg, P = 0.038), lo que podría relacionarse con diferencias hormonales (ejemplo: estrógenos) en la regulación hídrica y la retención de electrolitos. Otros indicadores como enzimas hepáticas, proteínas plasmáticas y función renal (NUS, creatinina) no variaron (P > 0.05), indicando que las diferencias sexuales se limitan a aspectos específicos del metabolismo energético y electrolítico, sin afectar la salud hepática o renal.

Color de la carne

La suplementación con AGA mostró efectos limitados en el color de la carne (Cuadro 13). El parámetro *b** (amarillez) a las 48 h presentó un efecto lineal significativo (P = 0.017), aumentando de 11.34 a 13.32 con la dosis (ecuación Y1: R^2 = 0.22), lo que sugiere que dosis altas de AGA podrían intensificar levemente el tono amarillo, posiblemente por cambios en la oxidación de lípidos o retención de carotenoides. En contraste, *L** (luminosidad) y *a** (rojez) no variaron significativamente (P > 0.05), aunque se observó una tendencia no lineal en *L** a 72 h (P = 0.079), con valores máximos a 1000 mg/kg (42.99 vs 38.4) respecto al grupo sin AGA. Estos resultados indican que el AGA tiene un impacto modesto en la coloración, principalmente en la intensidad del amarillo durante el almacenamiento, pero sin afectar atributos clave como el brillo o el rojo de la carne.

El sexo no mostró diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de los parámetros de color (P > 0.05). Sin embargo, se detectó una tendencia marginal en *b** a 48 h (P = 0.078), donde las hembras presentaron mayor amarillez (13.24 vs 12.15 en machos), posiblemente asociada a su mayor contenido lipídico (como se observó en cuadros anteriores).

Cuadro 13. Color de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Nivel de AGA mg/kg de MS[Z]						Valor de P		
Variables[Y]	0	1000	1500	2000	EEM	EQ	AGA	L	Q
n	6	6	6	6					
L 0 h	40.21	42.77	40.61	42.28	1.42	Y=41.42	0.509	0.437	0.666
L 24 h	40.01	41.88	40.55	41.14	1.18	Y=41.16	0.705	0.589	0.532
L 48 h	39.39	43.23	39.92	41.58	1.18	Y=40.99	0.115	0.352	0.238
L 72 h	38.4	42.99	39.82	40.95	1.21	Y=40.68	0.079	0.229	0.113
a 0 h	7.27	7.13	8.79	7.58	0.55	Y=7.54	0.157	0.296	0.684
a 24 h	9.22	9.35	10.63	9.46	0.62	Y=9.55	0.367	0.437	0.523
a 48 h	9.06	8.24	9.69	9.25	0.59	Y=8.91	0.383	0.568	0.475
a 72 h	9.46	9.40	9.49	9.12	0.58	Y=9.26	0.966	0.747	0.777
b 0 h	9.93	10.85	10.66	11.09	1.46	Y=10.48	0.642	0.246	0.797
b 24 h	12.01	13.24	14.12	13.11	0.61	Y=13.17	0.131	0.084	0.169
b 48 h	11.34	13.12	12.99	13.32	0.56	Y1	0.071	0.017	0.316
b 72 h	13.07	13.75	13.21	14.19	0.71	Y=13.51	0.662	0.374	0.836

[Z]AGA = ácido guanidinoacético; MS = materia seca; EEM = error estándar de la media; L = efecto lineal de dosis de AGA; Q = efecto cuadrático de dosis de AGA; EQ = ecuación; Y1 = 11.416 +0.00097429 × AGA (R^2=0.22).
[Y]Sistema de color CIEL*a*b*, donde L* = luminoacidad (0 = negro, 100 = blanco); a* = eje rojo-verde (-128 a +127; negativo = verde, positivo = rojo), b* = eje amarillo-azul (-128 a +127; negativo = azul, positivo = amarillo).

Variables como *L** y *a** fueron similares entre sexos en todos los tiempos evaluados, lo que sugiere que las diferencias fisiológicas entre machos y hembras no se traducen en cambios perceptibles en el color superficial de la carne (Cuadro 14). En conjunto, el sexo tuvo una influencia mínima en las propiedades colorimétricas, reforzando que factores como el tiempo de almacenamiento o la dieta son más relevantes que el dimorfismo sexual en este aspecto.

Cuadro 14. Efecto del sexo sobre el color de la carne de corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Sexo		
Variables[Z]	Macho	Hembra	Valor de P
n	16	8	
L 0 h	41.33 ± 0.86	41.62 ± 1.21	0.847
L 24 h	41.71 ± 0.71	40.08 ± 1.01	0.204
L 48 h	40.91 ± 0.71	41.16 ± 1.00	0.836
L 72 h	40.95 ± 0.73	40.13 ± 1.03	0.526

a 0 h	7.24 ± 0.33	8.15 ± 0.47	0.132
a 24 h	9.33 ± 0.38	10.01 ± 0.53	0.308
a 48 h	8.61 ± 0.36	9.51 ± 0.51	0.162
a 72 h	9.03 ± 0.35	9.70 ± 0.50	0.288
b 0 h	10.18 ± 0.40	11.08 ± 0.57	0.216
b 24 h	13.28 ± 0.37	12.96 ± 0.52	0.611
b 48 h	12.15 ± 0.34	13.24 ± 0.48	0.078
b 72 h	13.42 ± 0.43	13.69 ± 0.61	0.722

[Z]Sistema de color CIE L*a*b*, donde L* = luminoacidad (0 = negro, 100 = blanco); a* = eje rojo-verde (-128 a +127; negativo = verde, positivo = rojo), b* = eje amarillo-azul (-128 a +127; negativo = azul, positivo = amarillo). Todos los datos son presentados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar.

Análisis económico

La suplementación con AGA no mostró efectos estadísticamente significativos en los indicadores económicos (P > 0.05), aunque se observaron patrones numéricos relevantes (Cuadro 15). La utilidad bruta presentó una tendencia cuadrática marginal (P = 0.074), con valores más altos en los extremos de dosis (0 y 2000 mg/kg) que, en dosis intermedias, sugiriendo que niveles altos de AGA podrían mejorar levemente la rentabilidad. Los costos de producción (compra, alimentación, producción total) no variaron significativamente entre tratamientos, indicando que el AGA no incrementa los gastos operativos.

Cuadro 15. corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

	Nivel de AGA mg/kg de MS[Z]					Valor de P		
Variables[Y]	0	1000	1500	2000	EQ	AGA	L	Q
n	6	6	6	6				
CC, USD/cordero	105.15 ± 9.48	102.34 ± 9.48	110.83 ± 9.48	114.26 ± 9.48	Y=106.80	0.801	0.458	0.590
CA, USD/cordero	25.16 ± 1.43	27.84 ± 1.43	28.78 ± 1.43	27.01 ± 1.45	Y=27.40	0.338	0.227	0.206
CTP, USD/cordero	184.90 ± 1.43	187.58 ± 1.43	188.52 ± 1.43	186.74 ± 1.45	Y= 187.14	0.339	0.228	0.207
IVC, USD/cordero	272.25 ± 9.06	260.72 ± 9.11	260.26 ± 9.10	275.21 ± 9.20	Y=269.23	0.538	0.973	0.166
UB, USD/cordero	86.85 ± 8.79	71.78 ± 8.79	72.98 ± 8.79	90.75 ± 8.79	Y=82.09	0.324	0.994	0.074

[Z]AGA=ácido guanidinoacético; MS= materia seca; todos los datos son presentados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar; L = efecto lineal de dosis de AGA; Q = efecto cuadrático de dosis de AGA.
[Y]CC = costo de compra; CA = costo de alimentación; CTP = costo total de producción; IVC = Ingreso por venta de la canal; UB = utilidad bruta.

El ingreso por venta de la canal mostró fluctuaciones numéricas, sin un patrón claro, lo que refuerza que el impacto económico del AGA es modesto y no consistente.

El sexo no mostró diferencias estadísticamente significativas (P > 0.05) en los indicadores económicos (Cuadro 16). Sin embargo, los machos presentaron mayores ingresos por venta de canal y utilidad bruta, alineándose con su mejor desempeño productivo (mayor peso final y eficiencia alimenticia reportados previamente). Las hembras tuvieron costos de compra ligeramente superiores (8.09 USD). Los costos totales de producción fueron similares entre machos y hembras (187.54 vs 186.34 USD), indicando que las diferencias en rentabilidad se vinculan principalmente a la diferencia del ingreso por venta de la canal.

Cuadro 16. corderos alimentados con diferentes niveles de AGA.

Variables[Y]	Sexo[Z]		Valor de *P*
	Macho	Hembra	
n	16	8	
CC, USD/cordero	104.10 ± 5.71	112.19 ± 8.08	0.424
CA, USD/cordero	27.80 ± 0.86	26.60 ± 1.23	0.439
CTP, USD/cordero	187.54 ± 0.86	186.34 ± 1.23	0.440
IVC, USD/cordero	273.46 ± 5.49	260.77 ± 7.81	0.204
UB, USD/cordero	85.10 ± 5.29	76.08 ± 7.49	0.338

[Z]Todos los datos son presentados como medias de mínimos cuadrados ± error estándar
[Y]CC = costo de compra; CA = costo de alimentación; CTP = costo total de producción; IVC = Ingreso por venta de la canal; UB = utilidad bruta.

7.7 Discusión

Desempeño productivo

Los resultados de desempeño productivo obtenidos divergen parcialmente de estudios recientes, lo cual puede atribuirse a variabilidad racial, composición dietaria y la interacción entre AGA y aminoácidos protegidos. En corderos Kazakh, la suplementación con AGA (500-1,500 mg/kg MS) mejoró linealmente la ganancia diaria de peso, con incrementos significativos en creatina plasmática, IGF-I e insulina, particularmente con 1,500 mg/kg que promovió el crecimiento de manera más efectiva (S. Zhang et al., 2025). Similarmente, estudios en corderos Hu reportan

mejoras significativas en ganancia diaria (+14%), reducción en conversión alimenticia (-8.3%) y mayor peso final (+6.8%) con 750-1000 mg/kg de AGA (Jin et al., 2024). La inclusión simultánea de lisina y metionina protegidas (0.20% y 0.10%) en todos nuestros tratamientos podría haber enmascarado algunos efectos del AGA, modulando la absorción de nutrientes y alterando la respuesta metabólica esperada (H. Liu et al., 2021).

La suplementación con AGA en dietas para corderos mostró un patrón de respuesta cuadrática en parámetros clave como el índice de conversión, y la eficiencia alimenticia, con un óptimo estimado en ~853 mg/kg de MS. La respuesta no lineal observada en el índice de conversión alimenticia con suplementación de AGA puede explicarse por la saturación de los sistemas de absorción y metabolización a diferentes niveles de dosificación. En corderos Kazakh, estudios recientes demuestran que las tasas de escape ruminal de AGA oscilan entre 36-56% con suplementaciones de 500 a1,500 mg/kg de materia seca, donde la desaparición ruminal completa se logra en 8 horas para 500 mg/kg, pero permanece incompleta después de 12 horas para 1,500 mg/kg, sugiriendo saturación de los mecanismos de degradación ruminal a dosis altas (S. Zhang et al., 2025). En novillos, la suplementación con AGA (7.5-15 g/día) incrementa linealmente la excreción urinaria de nitrógeno sin mejorar la retención nitrogenada, particularmente cuando la metionina es limitante, indicando que la síntesis de creatina se prioriza sobre la deposición proteica cuando los grupos metilo son escasos (Speer et al., 2022). Adicionalmente, en novillos de engorda, la suplementación con 1 g/100 kg de peso corporal durante 112 días reguló positivamente genes asociados con hipertrofia muscular (IGF-1, cadenas pesadas de miosina), sugiriendo que los efectos del AGA dependen tanto de la dosis como de la duración del tratamiento (Eckhardt et al., 2024). La eficiencia diferencial según la dosificación se relaciona con la capacidad limitada de los transportadores intestinales y la competencia por grupos metilo en el ciclo de metionina, donde dosis intermedias pueden saturar parcialmente estos sistemas sin activar completamente las vías compensatorias observadas en dosis más altas (Eckhardt et al., 2024; S. Zhang et al., 2022).

Los machos exhibieron un 14% mayor eficiencia alimenticia que las hembras, a pesar de consumos similares, lo que refleja diferencias en el particionamiento energético. Este hallazgo se alinea con investigaciones en corderos Hu, donde la suplementación con AGA incrementó la expresión de ACC (acetil-CoA carboxilasa), enzima clave en la síntesis de ácidos grasos, sugiriendo una mayor capacidad de lipogénesis en músculo (Jin et al., 2024). La mayor deposición de masa magra en machos, asociada a niveles elevados de testosterona, podría potenciar la utilización de creatina para resíntesis de ATP, reduciendo así el costo energético por unidad de ganancia (Eckhardt et al., 2024).

Aunque la suplementación con AGA no mostró efectos lineales, su inclusión en dietas para corderos en fases de crecimiento acelerado podría ser estratégica para modular la eficiencia energética, particularmente en sistemas con restricciones de metionina (Speer et al., 2022). Sin embargo, la baja variabilidad explicada por el modelo cuadrático (R^2 = 0.06) subraya la necesidad de considerar factores adicionales, como interacciones genotipo-ambiente o mecanismos compensatorios metabólicos, la variabilidad individual en la absorción intestinal de AGA y la actividad de la guanidinoacetato N-metiltransferasa hepática, enzima limitante en la síntesis de creatina (Jin et al., 2024; S. Zhang et al., 2022). Estos resultados refuerzan el concepto de que la optimización de AGA en dietas para rumiantes requiere un enfoque personalizado, considerando no solo la dosificación, sino también el sexo, el estado fisiológico y la interacción con otros nutrientes donadores de grupos metilo (Eckhardt et al., 2024; Speer et al., 2022).

Características de la canal

La suplementación con AGA no modificó significativamente el peso al sacrificio, el peso de la canal caliente ni el rendimiento, lo que coincide con estudios en bovinos de engorda donde la adición de 1–2 g de AGA/100 kg PV no alteró las características básicas de la canal, a pesar de inducir cambios en la expresión génica muscular (Eckhardt et al., 2024). Sin embargo, se observaron efectos específicos en la deposición de grasa: en nuestro estudio, la grasa visceral

disminuyó linealmente con la dosis de AGA, lo que es consistente con reportes en corderos donde la suplementación con AGA redujo el espesor de grasa dorsal y los triglicéridos séricos, sugiriendo una modulación favorable del metabolismo lipídico (W. Li et al., 2023). Además, el área del ojo de la costilla mostró un patrón cuadrático, con un máximo teórico a dosis medias, lo que se alinea con resultados en corderos Kazakh, donde dosis intermedias de AGA optimizaron la deposición de masa magra y el flujo de nutrientes hacia el músculo, aunque con alta variabilidad individual atribuible a factores genéticos y diferencias en la actividad enzimática ruminal (S. Zhang et al., 2025). Respecto al dimorfismo sexual, los machos presentaron mayor peso corporal al sacrificio, pero menor rendimiento en canal, mientras que las hembras tendieron a mayor grasa dorsal y marmoleo. Estas diferencias se explican por la partición de nutrientes hacia tejido magro en machos y mayor capacidad lipogénica en hembras, mediada por efectos estrogénicos en la regulación de transportadores iónicos y enzimas metabólicas (Johnson et al., 2005). Estudios en ovinos suplementados con AGA destacan que las hembras optimizan la retención de electrolitos y la síntesis de lípidos, mientras que los machos priorizan el desarrollo muscular, reflejando adaptaciones fisiológicas intrínsecas al sexo (Johnson et al., 2005; Santos et al., 2007).

Calidad de la carne

La mejora significativa en la suavidad de la carne (reducción del 24.8-35.3% en fuerza de corte) observada con la suplementación de AGA se respalda por los mecanismos bioquímicos documentados en estudios recientes, donde la síntesis de creatina mediada por el AGA optimiza el metabolismo energético muscular y modifica la estructura del tejido conectivo (Ardalan et al., 2020). Lepetit (2008) estableció que la reducción del colágeno total y la modificación de su estructura (especialmente la disminución de enlaces cruzados de colágeno insoluble) son determinantes críticos de la terneza muscular, un hallazgo que respalda nuestra observación de una reducción del 15.8% en colágeno intramuscular con AGA. Esta disminución en el componente conectivo rígido podría facilitar la degradación

proteolítica postmortem, mejorando la suavidad. En corderos, S. Zhang et al. (2022) demostraron que la suplementación con AGA (500-1500 mg/kg MS) produjo cambios cuadráticos en la expresión de transportadores SLC6A6 y SLC6A8 en mucosa yeyunal e ileal, con la menor expresión relativa en el grupo de 1500 mg/kg, sugiriendo saturación de los sistemas de absorción que explica la respuesta no lineal observada en nuestro estudio, donde el óptimo teórico calculado en 1,285 mg/kg coincide con este rango de saturación. Similarmente, Jin et al. (2024) reportaron que la suplementación con AGA en ovejas Hu mejoró significativamente la fuerza de corte y el diámetro de fibra muscular, reduciendo simultáneamente la pérdida por goteo y la densidad de fibras musculares, efectos asociados con la regulación positiva de la expresión génica de acetil-CoA carboxilasa (ACC) en músculo, lo que respalda nuestros hallazgos de reducción del 15.8% en colágeno e incremento marginal del 3.3% en proteína. En bovinos, Eckhardt et al. (2024) confirmaron que la suplementación con AGA (1-2 g/100 kg peso corporal) durante 112 días reguló positivamente la expresión de IGF-1 y cadenas pesadas de miosina (MHC I y MHC IIA) en el músculo *Longissimus*, genes asociados con hipertrofia muscular y diferenciación de fibras, aunque sin afectar las características de la canal ni los valores de fuerza de corte Warner-Bratzler, lo que coincide con nuestros resultados donde los efectos se concentraron en componentes estructurales específicos del músculo. La ausencia de efectos significativos del AGA sobre las pérdidas por goteo (variación máxima de 4.4%) y la capacidad de retención de agua contrasta parcialmente con (S. Zhang et al., 2025), quienes observaron reducciones en pérdida por goteo, sugiriendo que la respuesta en la retención de agua del músculo puede depender de factores como la duración del tratamiento (90 días vs. períodos menores), la raza ovina y las interacciones con otros componentes dietarios.

El incremento transitorio del 5.7% en pH inicial con 1000 mg/kg de AGA, aunque no persistente a las 24 h, refleja una modulación temporal del metabolismo postmortem. Estudios en ovinos indican que mayores niveles de creatina hepática y ATP muscular, inducidos por AGA, pueden mejorar la estabilidad proteica,

reduciendo pérdidas por goteo y optimizando la retención hídrica (Jin et al., 2024; S. Zhang et al., 2022), un fenómeno documentado previamente por la correlación negativa entre pH y pérdidas por goteo en músculo postmortem (Otto et al., 2004). La suplementación con AGA en corderos incrementa la biodisponibilidad de creatina, con tasas de degradación ruminal del ~50% que limitan su absorción intestinal (Speer et al., 2022). Aunque no se observaron diferencias significativas en atributos sensoriales, la variabilidad en respuestas metabólicas subraya la influencia de factores como la dosis y el tiempo de suplementación (Eckhardt et al., 2024; S. Zhang et al., 2022). Estos hallazgos respaldan estrategias de suplementación con AGA en dosis de 500–1000 mg/kg MS, optimizando la eficiencia energética sin comprometer parámetros clave de calidad (S. Zhang et al., 2022).

Química sanguínea

La suplementación con AGA en corderos demostró un perfil de seguridad metabólica en las dosis evaluadas (0–2000 mg/kg MS), sin efectos significativos ($P > 0.05$) en glucosa, nitrógeno ureico (NUS), enzimas hepáticas (AST, GLDH) y electrolitos como sodio y potasio, lo que concuerda con intervalos de referencia hematológicos establecidos para ovinos (Frye et al., 2022; S. Zhang et al., 2022). La excepción fue el cloro, que mostró un efecto cuadrático significativo ($P = 0.041$), sugiriendo una modulación dosis-dependiente en la reabsorción tubular renal mediada por regulación del cotransportador Na^+-K^+-$2Cl^-$ (Speer et al., 2022). Estos hallazgos respaldan que el AGA no compromete la función hepatorrenal, incluso en dosis elevadas, y coinciden con estudios en bovinos donde mejora la eficiencia energética muscular mediante incrementos lineales de ATP y fosfocreatina (Eckhardt et al., 2024; S. Zhang et al., 2022). La estabilidad de proteínas plasmáticas y enzimas hepáticas refuerza que el AGA no induce estrés oxidativo, corroborando su seguridad en dietas para rumiantes (Eckhardt et al., 2024).

Las diferencias sexuales observadas (mayor glucosa en machos y electrolitos en hembras) reflejan mecanismos fisiológicos intrínsecos. Los niveles elevados de sodio (+1.44 mmol/L) y cloro (+1.79 mmol/L) en hembras podrían explicarse por

efectos estrogénicos en la regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, un fenómeno documentado en pequeños rumiantes bajo condiciones nutricionales similares (Jin et al., 2024). Estos hallazgos subrayan la importancia de ajustar estrategias nutricionales según el sexo, particularmente en sistemas intensivos donde la eficiencia metabólica es crítica. Aunque no se observaron cambios en características de la canal, la tendencia cuadrática en AST (P = 0.096) sugiere que dosis superiores a 1500 mg/kg podrían inducir estrés muscular transitorio, respaldando la recomendación de suplementar entre 500–1000 mg/kg de AGA para optimizar la síntesis de creatina sin comprometer la absorción intestinal (Zhang et al., 2022; Speer et al., 2022).

Color de la carne

La inclusión de AGA en las dietas tuvo efectos limitados en los parámetros de color de la carne de cordero. La $b*$ (amarillez) a las 48 h presentó un efecto cuadrático significativo (P = 0.041), aumentando de 11.34 a 13.32 con dosis crecientes de AGA (ecuación Y1: R^2 = 0.19), lo que sugiere una modulación dosis-dependiente en la oxidación lipídica o retención de carotenoides durante el almacenamiento (Zhang et al., 2022). Este hallazgo contrasta parcialmente con estudios en bovinos, donde la suplementación con AGA no alteró significativamente $L*$ (luminosidad), $a*$ (rojez) o $b*$, indicando diferencias especie-específicas en la respuesta metabólica (Eckhardt et al., 2024). La tendencia cuadrática en $L*$ a las 72 h (P = 0.079) podría relacionarse con cambios en la estructura proteica o pH muscular postmortem, factores que influyen en la dispersión de la luz (S. Zhang et al., 2022). La estabilidad de $a*$ y $L*$ en la mayoría de los tiempos evaluados respalda que el AGA no altera atributos críticos del color. Sin embargo, la mayor amarillez en hembras (P=0.078) podría vincularse a su mayor contenido lipídico intramuscular, un fenómeno documentado en ovinos suplementados con AGA, donde la mejora en la capacidad antioxidante (superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) redujo la peroxidación lipídica (Jin et al., 2024). Estos resultados subrayan que el impacto del AGA en la coloración

depende de interacciones entre la dosis, el tiempo de almacenamiento y la composición tisular (S. Zhang et al., 2022).

Análisis económico

La tendencia cuadrática en utilidad bruta (P = 0.074) se asocia principalmente a variaciones numéricas en el rendimiento de canal y diferencias en el peso de canal caliente, factores que impactan los ingresos por venta al multiplicarse por el precio comercial por kilogramo. Aunque la reducción lineal en la puntuación de grasa RPC (P = 0.01) podría influir en la valoración subjetiva de compradores que priorizan canales magras, este parámetro no se correlacionó con mediciones cuantitativas de grasa removida, lo que sugiere que su efecto económico deriva de percepciones visuales en sistemas de clasificación basados en inspección ocular.

Los costos de producción no variaron significativamente entre tratamientos (P > 0.05), indicando que el impacto económico del AGA se vincula a mejoras en atributos cualitativos más que a reducciones operativas. El dimorfismo sexual marcado en parámetros productivos y composición de canal subraya la necesidad de estrategias diferenciadas: los machos aprovecharían mejor las dosis medias-altas para optimizar terneza, mientras las hembras requerirían enfoques complementarios para capitalizar su mayor contenido graso.

El efecto cuadrático refleja una interacción compleja entre costos marginales de suplementación (0.357–0.364 USD/kg dieta) e ingresos asociados a ligeras mejoras en rendimiento y calidad visual de la canal. La viabilidad económica del AGA depende de su capacidad para capitalizar mejoras sensoriales (menor fuerza de corte, RPC visual reducida) en sistemas donde la valoración comercial integra atributos técnicos y preferencias del consumidor, incluso sin ahorros directos por reducción de grasa no comercial.

7.8 Conclusión y recomendaciones

La suplementación con ácido guanidinoacético (AGA) en corderos en fase de finalización demostró efectos específicos sobre la calidad de la carne y la composición tisular, sin alterar significativamente el desempeño productivo general. Aunque no se observaron mejoras lineales en parámetros como la ganancia diaria de peso o el consumo de alimento, el AGA redujo la fuerza de corte de la carne (24.8–35.3%) y disminuyó el contenido de colágeno intramuscular (15.8%), mejorando su suavidad. Además, la reducción lineal de grasa visceral (RPC) sugiere una modulación favorable del metabolismo lipídico, priorizando la deposición magra. Las diferencias sexuales fueron determinantes: los machos mostraron mayor eficiencia alimenticia y desarrollo muscular, mientras las hembras tendieron a mayor contenido graso y retención de electrolitos. La estabilidad en parámetros bioquímicos séricos (glucosa, enzimas hepáticas, electrolitos) respalda la seguridad metabólica del AGA en dosis de hasta 2000 mg/kg MS, aunque su impacto económico fue modesto, con tendencias cuadráticas en utilidad bruta vinculadas a mejoras numéricas en el rendimiento de canal y peso de canal caliente, factores que impactan directamente los ingresos por venta.

Se recomiendan dosis de AGA entre 1000–1500 mg/kg MS para optimizar la suavidad y reducir grasa visceral. Implementar estrategias por sexo: en machos, priorizar AGA para crecimiento magro; en hembras, combinarlo con antioxidantes para contrarrestar oxidación lipídica (*b**). Futuros estudios deben explorar sinergias con metionina/colina para síntesis de creatina y expresión génica muscular (ACC, IGF-1). A nivel productivo, evaluar costos-beneficios considerando reducción de grasa no comercial y mejora sensorial para mercados premium. Validar resultados en sistemas extensivos y monitorear efectos a largo plazo en salud renal/hepática.

7.9 Referencias

AMSA. (2016). *Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat: Vol. Version 1.02* (2nd ed.,

Issue 1.02). American Meat Science Association. http://www.meatscience.org/sensory

Anderson, S., Aldana, S., Beggs, M., Birkey, J., Conquest, A., Conway, R., Hemminger, T., Herrick, J., Hurley, C., Ionita, C., Longbind, J., McMaignal, S., Milu, A., Mitchell, T., Nanke, K., Perez, A., Phelps, M., Reitz, J., Salazar, A., … Zerr, S. (2007). Determination of Fat, Moisture, and Protein in Meat and Meat Products by Using the FOSS FoodScan Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated Database: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *90*(4), 1073–1083. https://doi.org/10.1093/jaoac/90.4.1073

AOAC. (1997). *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis* (sixteenth). AOAC.

AOAC. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016. *20th Ed. Gaithersburg: AOAC.*

Ardalan, M., Batista, E. D., & Titgemeyer, E. C. (2020). Effect of post-ruminal guanidinoacetic acid supplementation on creatine synthesis and plasma homocysteine concentrations in cattle. *Journal of Animal Science*, *98*(3). https://doi.org/10.1093/JAS/SKAA072

Chávez-Espinoza, M., Cantú-Silva, I., González-Rodríguez, H., & Montañez-Valdez, O. D. (2022). Sistemas de producción de pequeños rumiantes en México y su efecto en la sostenibilidad productiva. *Revista MVZ Córdoba*, *27*(1), e2246. https://doi.org/10.21897/rmvz.2246

Colomer-Rocher, F., Delfa, R., & Sierra, I. (1988). Método normalizado para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales ovinas producidas en el área mediterránea, según los sistemas de producción. *Les carcasses d'agneaux et de chevreaux méditerranéens, 9-10 de diciembre de 1986, Zaragoza*, 19–41.

Eckhardt, E. P., Kim, W., Jaborek, J., Garmyn, A. J., Kang, D., & Kim, J. (2024). Evaluation of guanidinoacetic acid supplementation on finishing beef steer growth performance, skeletal muscle cellular response, and carcass characteristics. *Journal of Animal Science*, *102*. https://doi.org/10.1093/jas/skae337

Fevold, M. A., Maddock-Carlin, K. R., Keller, W. L., & Hoffman, T. W. (2024). Fresh and Frozen Storage on Meat Quality and Sensory Attributes of Lamb Loins and Legs. *Meat and Muscle Biology*, *8*(1). https://doi.org/10.22175/mmb.15701

Frye, E. A., Behling-Kelly, E. L., Lejuene, M., & Webb, J. L. (2022). Complete blood count and biochemistry reference intervals for healthy adult sheep in the northeastern United States. *Veterinary Clinical Pathology*, *51*(1), 119–125. https://doi.org/10.1111/vcp.13059

García, de M. E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana*. UNAM Instituto de Geografía.

Jin, H., Du, Z., Fan, X., Qin, L., Liu, W., Zhang, Y., Ren, J., Ye, C., & Liu, Q. (2024). Effect of Guanidinoacetic Acid on Production Performance, Serum Biochemistry, Meat Quality and Rumen Fermentation in Hu Sheep. *Animals*, *14*(14), 2052. https://doi.org/10.3390/ani14142052

Johnson, P. L., Purchas, R. W., McEwan, J. C., & Blair, H. T. (2005). Carcass composition and meat quality differences between pasture-reared ewe and ram lambs. *Meat Science*, *71*(2), 383–391. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.021

Li, S. Y., Wang, C., Wu, Z. Z., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Zhang, J., Chen, L., Zhang, Y. L., Pei, C. X., & Zhang, S. L. (2020). Effects of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion, rumen fermentation

and blood metabolites in Angus bulls. *Animal*, *14*(12), 2535–2542. https://doi.org/10.1017/S1751731120001603

Li, W., Cui, Z., Jiang, Y., Aisikaer, A., Wu, Q., Zhang, F., Wang, W., Bo, Y., & Yang, H. (2023). Dietary Guanidine Acetic Acid Improves Ruminal Antioxidant Capacity and Alters Rumen Fermentation and Microflora in Rapid-Growing Lambs. *Antioxidants*, *12*(3), 772. https://doi.org/10.3390/antiox12030772

Li, Z., Liang, H., Xin, J., Xu, L., Li, M., Yu, H., Zhang, W., Ge, Y., Li, Y., & Qu, M. (2021). Effects of Dietary Guanidinoacetic Acid on the Feed Efficiency, Blood Measures, and Meat Quality of Jinjiang Bulls. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684295

Liu, H., Yang, G., Degen, A., Ji, K., Jiao, D., Liang, Y., Xiao, L., Long, R., & Zhou, J. (2021). Effect of feed level and supplementary rumen protected lysine and methionine on growth performance, rumen fermentation, blood metabolites and nitrogen balance in growing Tan lambs fed low protein diets. *Animal Feed Science and Technology*, *279*, 115024. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115024

National Research Council. (2007). *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. National Academies Press. https://doi.org/10.17226/11654

Ostojic, S. M. (2015). Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *European Journal of Nutrition*, *54*(8), 1211–1215. https://doi.org/10.1007/s00394-015-1050-7

Otto, G., Roehe, R., Looft, H., Thoelking, L., & Kalm, E. (2004). Comparison of different methods for determination of drip loss and their relationships to meat quality and carcass characteristics in pigs. *Meat Science*, *68*(3), 401–409. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.007

Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, *83*(2), 175–186. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.04.016

Ren, G., Hao, X., Zhang, X., Liu, S., & Zhang, J. (2022). Effects of guanidinoacetic acid and betaine on growth performance, energy and nitrogen metabolism, and rumen microbial protein synthesis in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, *292*, 115402. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115402

SAGARPA. (2001). *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999, Technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals]*. Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

SAGARPA. (2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres [Mexican Official Standard NOM-033-SAG/ZOO-2014, Methods for the Slaughter of Domestic and Wild Animals].* (pp. 1–48). Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-033-sag-zoo-2014-metodos-para-dar-muerte-a-los-animales-domesticos-y-silvestres

Santos, V. A. C., Silva, S. R., Mena, E. G., & Azevedo, J. M. T. (2007). Live weight and sex effects on carcass and meat quality of “Borrego terrincho–PDO” suckling lambs. *Meat Science*, *77*(4), 654–661. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.019

Sañudo, C., Alfonso, M., Sánchez, A., Delfa, R., & Teixeira, A. (2000). Carcass and meat quality in light lambs from different fat classes in the EU carcass

classification system. *Meat Science*, *56*(1), 89–94. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00026-7

SAS Institute Inc. (2012). *SAS/STAT® 9.4 User's Guide*. SAS Institute Inc.

Speer, H. F., Grant, M. S., Miesner, M. D., & Titgemeyer, E. C. (2022). Effect of guanidinoacetic acid supplementation on nitrogen retention and methionine methyl group flux in growing steers fed corn-based diets. *Journal of Animal Science*, *100*(10). https://doi.org/10.1093/jas/skac283

Speer, H. F., Pearl, K. A., & Titgemeyer, E. C. (2020). Relative bioavailability of guanidinoacetic acid delivered ruminally or abomasally to cattle. *Journal of Animal Science*, *98*(9), 1–6. https://doi.org/10.1093/jas/skaa282

Stockman, S. L., & Scott, M. A. (2008). *Fundamentals of veterinary clinical pathology* (2nd ed.). Blackwell Publishing.

Szmańko, T., Lesiów, T., & Górecka, J. (2021). The water-holding capacity of meat: A reference analytical method. *Food Chemistry*, *357*, 129727. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129727

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3583–3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Vazquez-Mendoza, O. V., Elghandour, M. M. M. Y., Mariezcurrena Berasain, M. A., Inyang, U. A., Jack, A., Lackner, M., & Salem, A. Z. M. (2024). Guanidinoacetic acid effects on ruminal fermentation, digestibility and methane production in sheep liquor: Dose-response analysis. *Journal of Agriculture and Food Research*, *18*, 101540. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101540

Wang, J., Zhang, Y., Wang, X., Li, F., Zhang, D., Li, X., Zhao, Y., Zhao, L., Xu, D., Cheng, J., Li, W., Lin, C., Yang, X., Zhai, R., Zeng, X., Cui, P., Ma, Z., Liu, J.,

Zhang, X., & Wang, W. (2022). Association between rumen microbiota and marbling grade in Hu sheep. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.978263

Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*, *80*(3), 1107–1213. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107

Zhang, J. H., Li, H. H., Zhang, G. J., Zhang, Y. H., Liu, B., Huang, S., Guyader, J., & Zhong, R. Z. (2022). Supplementation of guanidinoacetic acid and rumen-protected methionine increased growth performance and meat quality of Tan lambs. *Animal Bioscience*, *35*(10), 1556–1565. https://doi.org/10.5713/ab.22.0008

Zhang, S., Yimamu, M., Ma, C., Pan, J., Wang, C., Cai, W., & Yang, K. (2025). Dietary guanidinoacetic acid supplementation improves rumen metabolism, duodenal nutrient flux, and growth performance in lambs. *Frontiers in Veterinary Science*, *12*. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1528861

Zhang, S., Zang, C., Pan, J., Ma, C., Wang, C., Li, X., Cai, W., & Yang, K. (2022). Effects of dietary guanidinoacetic acid on growth performance, guanidinoacetic acid absorption and creatine metabolism of lambs. *PLOS ONE*, *17*(3), e0264864. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264864

8. Discusión general

Los estudios experimentales demostraron que la suplementación con ácido guanidinoacético en dietas para ovinos en finalización ejerce efectos dosis-dependientes sobre la fermentación ruminal y la producción de gases. En dietas con 10% de heno de alfalfa, dosis de 1500–2000 mg/kg de MS reducen la producción de metano (CH_4) en un 15% por unidad de materia orgánica degradada, mientras incrementan los ácidos grasos volátiles (AGV) en un 33% y la energía metabolizable (EM) en 15%. Este efecto se atribuye al desplazamiento de hidrógenos metabólicos hacia la síntesis de propionato, reduciendo la disponibilidad de sustratos para la metanogénesis. Sin embargo, dosis superiores a 2500 mg/kg disminuyen la degradación de la fibra y aumentan las emisiones de CH_4, evidenciando una respuesta no lineal. La eficacia del AGA depende críticamente de la composición dietaria: en dietas con 100% alfalfa, los efectos son mínimos, mientras que la inclusión de 10–25% de alfalfa optimiza su acción.

Respecto al crecimiento y características de la canal, el estudio *in vivo* revelo que dosis de AGA de 1000–1500 mg/kg de MS mejoran numéricamente el marmoleo de la carne y reducen linealmente la calificación de deposición de grasa en riñón pelvis y corazón. Estos beneficios se vinculan al rol del AGA en el metabolismo energético muscular mediante la síntesis de creatina, aunque en este estudio la ganancia diaria de peso (GDP) o conversión alimenticia no fueron afectados. La digestibilidad de la proteína cruda (PC) muestra una respuesta cuadrática: la dosis de 2000 mg/kg maximiza la digestibilidad empírica (53.19% vs 49.08% del control), mientras que el modelo matemático sugiere un óptimo teórico a 1437 mg/kg, no validado experimentalmente pero dentro del rango de dosis evaluadas.

Para la aplicación práctica de AGA, la dosis óptima de 500–2000 mg/kg MS en dietas con 10–25% de alfalfa equilibra beneficios ambientales y productivos: reduce la huella de carbono (-15% CH_4, -20% H_2S) y mejora la eficiencia energética. Sin embargo, dosis superiores a 2500 mg/kg comprometen la degradación de la materia seca y aumentan costos sin ventajas adicionales. La rentabilidad podría

potencializarse al combinar AGA con dietas basadas en alfalfa, donde se sinergizan los efectos positivos en fermentación y calidad de canal. Se requieren más estudios *in vivo* para validar impactos en parámetros zootécnicos y confirmar los hallazgos reportados en esta investigación.

9. Conclusiones

Los estudios experimentales demostraron que la suplementación con AGA en ovinos en etapa de finalización ejerce efectos dosis-dependientes significativos sobre la fermentación ruminal, la producción de gases de efecto invernadero y las características productivas. Los hallazgos clave, se resumen en los siguientes puntos:

1. Dosis óptima y respuesta no lineal

La dosis óptima de AGA se establece en 500–2000 mg/kg de MS. Este rango maximiza beneficios como: reducción del 15% en metano (CH_4) por unidad de materia orgánica degradada. Disminución del 20% en sulfuro de hidrógeno (H_2S). Aumento de ácidos grasos volátiles (AGV) y energía metabolizable (EM). Dosis superiores a 2500 mg/kg comprometen la fermentación: reducen la degradación de fibra, aumentan las emisiones de CH_4 y no aportan beneficios adicionales.

2. Dependencia crítica de la dieta

La eficacia del AGA está directamente ligada a la composición de la dieta: dietas con 10–25% de heno de alfalfa (HA) potencian los efectos positivos del AGA, mejorando la eficiencia fermentativa y reduciendo la huella de carbono. Dietas con 100% de HA muestran respuestas mínimas al AGA, incluso con dosis altas. La interacción AGA-dieta subraya la necesidad de ajustar la suplementación según la base forrajera de la dieta.

3. Impacto en calidad de canal y sostenibilidad

La suplementación con ácido guanidinoacético (AGA) en corderos en fase de finalización demostró efectos específicos sobre la calidad de la carne y la composición tisular, sin alterar significativamente el desempeño productivo general. Aunque no se observaron mejoras lineales en parámetros como la ganancia diaria de peso, el consumo de alimento o conversión alimenticia, el AGA redujo la fuerza de corte de la carne (24.8–35.3%) y disminuyó el contenido de colágeno intramuscular (15.8%), mejorando su suavidad. Además, la reducción lineal de grasa visceral (RPC) sugiere una modulación favorable del metabolismo lipídico, priorizando la deposición magra. Se recomiendan dosis de AGA entre 1000–1500 mg/kg MS para optimizar la suavidad de la carne y reducir grasa visceral.

Estos beneficios, combinados con la mitigación de gases de efecto invernadero (CH_4 y H_2S), posicionan al AGA como una herramienta para una producción ovina rentable y ambientalmente sostenible.

4. Perspectivas futuras

Futuros estudios deben enfocarse en desarrollar protocolos de protección ruminal del AGA, explorar sinergias con metionina/colina para síntesis de creatina y expresión génica muscular (ACC, IGF-1), validar resultados en sistemas extensivos, monitorear efectos a largo plazo en salud renal/hepática, y comparar su eficacia con otros aditivos (ej. β-adrenérgicos) en sistemas intensivos.

El AGA es un aditivo estratégico para la producción ovina, con potencial para mejorar la eficiencia fermentativa, la calidad de la canal y la sostenibilidad ambiental. Su implementación exitosa requiere ajustes precisos de dosis (500–2000 mg/kg MS) y composición de la dieta (10–25% de heno de alfalfa), evitando excesos que generen efectos contraproducentes. Esta investigación sienta bases para optimizar el uso del AGA en sistemas de finalización de corderos en corral, equilibrando beneficios productivos y ambientales.

10. Literatura citada

Acosta, J. A. D., Elghandour, M. M. M. Y., Mariezcurrena-Berasain, M. D., Adegbeye, M. J., Fajemisin, A. N., Pliego, A. B., & Salem, A. Z. M. (2022). Effect of Mid-Term Dietary Administration of the Caesalpinia coriaria Extract on the Sustainable Mitigation of Equine Fecal Methane, Carbon Monoxide and Hydrogen Sulfide Production. *Journal of Equine Veterinary Science*, *115*, 104021. https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104021

Alvarado-Ramírez, E. R., Maggiolino, A., Elghandour, M. M. M. Y., Rivas-Jacobo, M. A., Ballesteros-Rodea, G., Palo, P. De, & Salem, A. Z. M. (2023). Impact of Co-Ensiling of Maize with Moringa oleifera on the Production of Greenhouse Gases and the Characteristics of Fermentation in Ruminants. *Animals*, *13*(4), 764. https://doi.org/10.3390/ani13040764

AMSA. (2016). *Research Guidelines for Cookery, Sensory Evaluation, and Instrumental Tenderness Measurements of Meat: Vol. Version 1.02* (2nd ed., Issue 1.02). American Meat Science Association. http://www.meatscience.org/sensory

Anderson, S., Aldana, S., Beggs, M., Birkey, J., Conquest, A., Conway, R., Hemminger, T., Herrick, J., Hurley, C., Ionita, C., Longbind, J., McMaignal, S., Milu, A., Mitchell, T., Nanke, K., Perez, A., Phelps, M., Reitz, J., Salazar, A., … Zerr, S. (2007). Determination of Fat,Moisture, and Protein in Meat and Meat Products by Using the FOSS FoodScan Near-Infrared Spectrophotometer with FOSS Artificial Neural Network Calibration Model and Associated Database: Collaborative Study. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, *90*(4), 1073–1083. https://doi.org/10.1093/jaoac/90.4.1073

AOAC. (1997). *Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis* (sixteenth). AOAC.

AOAC. (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International - 20th Edition, 2016. *20th Ed. Gaithersburg: AOAC.*

Arce-Recinos, C., Chay-Canul, A. J., Alarcón-Zúñiga, B., Ramos-Juárez, J. A., Vargas-Villamil, L. M., Aranda-Ibáñez, E. M., Sánchez-Villegas, N. D. C., & Lopez Dias da Costa, R. (2021). Índices de eficiencia alimenticia en ovinos de pelo: calidad de la carne y genes asociados. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, *12*(2), 523–552. https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i2.5642

Ardalan, M., Batista, E. D., & Titgemeyer, E. C. (2020). Effect of post-ruminal guanidinoacetic acid supplementation on creatine synthesis and plasma homocysteine concentrations in cattle. *Journal of Animal Science*, *98*(3). https://doi.org/10.1093/JAS/SKAA072

Balestrino, M., & Adriano, E. (2020). Presence of guanidinoacetate may compensate creatine absence and account for less statin-induced muscle damage in GAMT-deficient compared to AGAT-deficient mice. In *Amino Acids* (Vol. 52, Issue 4, pp. 667–669). Springer. https://doi.org/10.1007/s00726-020-02838-z

Brosnan, J. T., Wijekoon, E. P., Warford-Woolgar, L., Trottier, N. L., Brosnan, M. E., Brunton, J. A., & Bertolo, R. F. P. (2009). Creatine synthesis is a major metabolic process in neonatal piglets and has important implications for amino acid metabolism and methyl balance. *Journal of Nutrition*, *139*(7), 1292–1297. https://doi.org/10.3945/jn.109.105411

Chávez-Espinoza, M., Cantú-Silva, I., González-Rodríguez, H., & Montañez-Valdez, O. D. (2022). Sistemas de producción de pequeños rumiantes en México y su efecto en la sostenibilidad productiva. *Revista MVZ Córdoba*, *27*(1), e2246. https://doi.org/10.21897/rmvz.2246

Colomer-Rocher, F., Delfa, R., & Sierra, I. (1988). Método normalizado para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales ovinas producidas en el área mediterránea, según los sistemas de producción. *Les*

carcasses d'agneaux et de chevreaux méditerranéens, 9-10 de diciembre de 1986, Zaragoza, 19–41.

Correa, C. H. J. (2009). Estimación de la degradabilidad efectiva en el rumen mediante métodos numéricos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *22*, 19–24. Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=295023521004

Dilger, R. N., Bryant-Angeloni, K., Payne, R. L., Lemme, A., & Parsons, C. M. (2013). Dietary guanidino acetic acid is an efficacious replacement for arginine for young chicks. *Poultry Science*, *92*(1), 171–177. https://doi.org/10.3382/ps.2012-02425

Dong, C., Wei, M., Ju, J., Du, L., Zhang, R., Xiao, M., Zheng, Y., Bao, H., & Bao, M. (2024). Effects of guanidinoacetic acid on in vitro rumen fermentation and microflora structure and predicted gene function. *Frontiers in Microbiology*, *14*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285466

Eckhardt, E. P., Kim, W., Jaborek, J., Garmyn, A. J., Kang, D., & Kim, J. (2024). Evaluation of guanidinoacetic acid supplementation on finishing beef steer growth performance, skeletal muscle cellular response, and carcass characteristics. *Journal of Animal Science*, *102*. https://doi.org/10.1093/jas/skae337

Edison, E. E., Brosnan, M. E., Meyer, C., & Brosnan, J. T. (2007). Creatine synthesis: production of guanidinoacetate by the rat and human kidney in vivo. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, *293*(6), F1799-804. https://doi.org/10.1152/ajprenal.00356.2007

EFSA FEEDAP. (2016). Safety and efficacy of guanidinoacetic acid for chickens for fattening, breeder hens and roosters, and pigs. *EFSA Journal*, *14*(2). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4394

Faraji, M., Karimi Dehkordi, S., Zamiani Moghadam, A. K., Ahmadipour, B., & Khajali, F. (2019). Combined effects of guanidinoacetic acid, coenzyme Q10 and taurine on growth performance, gene expression and ascites mortality in broiler chickens. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, *103*(1), 162–169. https://doi.org/10.1111/jpn.13020

Farshidfar, F., Pinder, M. A., & Myrie, S. B. (2017). Creatine Supplementation and Skeletal Muscle Metabolism for Building Muscle Mass- Review of the Potential Mechanisms of Action. *Curr Protein Pept Sci*, *18*(12), 1273–1287. https://doi.org/10.2174/1389203718666170606105108

Fevold, M. A., Maddock-Carlin, K. R., Keller, W. L., & Hoffman, T. W. (2024). Fresh and Frozen Storage on Meat Quality and Sensory Attributes of Lamb Loins and Legs. *Meat and Muscle Biology*, *8*(1). https://doi.org/10.22175/mmb.15701

France, J., Dhanoa, M. S., Theodorou, M. K., Lister, S. J., Davies, D. R., & Isac, D. (1993). A Model to Interpret Gas Accumulation Profiles Associated with In Vitro Degradation of Ruminant Feeds. *Journal of Theoretical Biology*, *163*(1), 99–111. https://doi.org/10.1006/jtbi.1993.1109

France, J., Dijkstra, J., Dhanoa, M. S., Lopez, S., & Bannink, A. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro* :derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition*, *83*(2), 143–150. https://doi.org/10.1017/S0007114500000180

Frye, E. A., Behling-Kelly, E. L., Lejuene, M., & Webb, J. L. (2022). Complete blood count and biochemistry reference intervals for healthy adult sheep in the northeastern United States. *Veterinary Clinical Pathology*, *51*(1), 119–125. https://doi.org/10.1111/vcp.13059

García, de M. E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen: para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana*. UNAM Instituto de Geografía.

Getachew, G., Crovetto, G. M., Fondevila, M., Krishnamoorthy, U., Singh, B., Spanghero, M., Steingass, H., Robinson, P. H., & Kailas, M. M. (2002). Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, *102*(1–4), 169–180. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00212-2

Goering, H. K., & Van Soest, P. J. (1970). *Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications)* (Vol. 379). Agricultural Research Service, USDA.

Gonzales, E. B., Smith, R. N., & Agharkar, A. S. (2014). A review of creatine supplementation in age-related diseases: More than a supplement for athletes. In *F1000Research* (Vol. 3). Faculty of 1000 Ltd. https://doi.org/10.12688/f1000research.5218.1

Jayaraman, B., La, K. V., La, H., Doan, V., Carpena, E. M., Rademacher, M., & Channarayapatna, G. (2018). Supplementation of guanidinoacetic acid to pig diets: Effects on performance, carcass characteristics, and meat quality. *Journal of Animal Science*, *96*(6), 2332–2341. https://doi.org/10.1093/jas/sky137

Jin, H., Du, Z., Fan, X., Qin, L., Liu, W., Zhang, Y., Ren, J., Ye, C., & Liu, Q. (2024). Effect of Guanidinoacetic Acid on Production Performance, Serum Biochemistry, Meat Quality and Rumen Fermentation in Hu Sheep. *Animals*, *14*(14), 2052. https://doi.org/10.3390/ani14142052

Johnson, P. L., Purchas, R. W., McEwan, J. C., & Blair, H. T. (2005). Carcass composition and meat quality differences between pasture-reared ewe and ram lambs. *Meat Science*, *71*(2), 383–391. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.04.021

Joncquel-Chevalier Curt, M., Voicu, P. M., Fontaine, M., Dessein, A. F., Porchet, N., Mention-Mulliez, K., Dobbelaere, D., Soto-Ares, G., Cheillan, D., & Vamecq, J. (2015). Creatine biosynthesis and transport in health and disease. In *Biochimie* (Vol. 119, pp. 146–165). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.10.022

Khajali, F., Lemme, A., & Rademacher-Heilshorn, M. (2020). Guanidinoacetic acid as a feed supplement for poultry. In *World's Poultry Science Journal* (Vol. 76, Issue 2, pp. 270–291). Taylor and Francis Ltd. https://doi.org/10.1080/00439339.2020.1716651

Khalil, S., Saenbungkhor, N., Kesnava, K., Sivapirunthep, P., Sitthigripong, R., Jumanee, S., & Chaosap, C. (2021). Effects of guanidinoacetic acid supplementation on productive performance, pectoral myopathies, and meat quality of broiler chickens. *Animals*, *11*(11). https://doi.org/10.3390/ani11113180

Lemme, A., Degroot, R., Dilger, R., & Braun, U. (2018). Digestibility of guanidinoacetic acid is 100% in broilers while availability depends on dosage and dietary arginine supply. *Poultry Science*, *97*, 102. https://poultryscience.org/files/galleries/2018-PSA-Annual_Meeting_Abstracts.pdf

Lemme, A., Gobbi, R., & Esteve-Garcia, E. (2010). Effectiveness of creatine sources on performance of broilers at deficient or dequate methionine supply. *Proceedings of 13th European Poultry Conference*, 5.

Lepetit, J. (2008). Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, *80*(4), 960–967. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.016

Li, S. Y., Wang, C., Wu, Z. Z., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Zhang, J., Chen, L., Zhang, Y. L., Pei, C. X., & Zhang, S. L. (2020). Effects of guanidinoacetic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion, rumen fermentation

and blood metabolites in Angus bulls. *Animal*, *14*(12), 2535–2542. https://doi.org/10.1017/S1751731120001603

Li, W., Cui, Z., Jiang, Y., Aisikaer, A., Wu, Q., Zhang, F., Wang, W., Bo, Y., & Yang, H. (2023). Dietary Guanidine Acetic Acid Improves Ruminal Antioxidant Capacity and Alters Rumen Fermentation and Microflora in Rapid-Growing Lambs. *Antioxidants*, *12*(3), 772. https://doi.org/10.3390/antiox12030772

Li, W.-J., Zhang, F., Pei, S.-T., He, S.-S., Xiong, F.-L., Lv, L.-K., & Yang, H.-J. (2023). The Effect of Guanidinoacetic Acid Addition on In Vitro Rumen Fermentation Characteristics and Gas Production of Early- and Late-Stage Sheep-Fattening Diets. *Fermentation*, *9*(6), 549. https://doi.org/10.3390/fermentation9060549

Li, Z., Liang, H., Xin, J., Xu, L., Li, M., Yu, H., Zhang, W., Ge, Y., Li, Y., & Qu, M. (2021). Effects of Dietary Guanidinoacetic Acid on the Feed Efficiency, Blood Measures, and Meat Quality of Jinjiang Bulls. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*. https://doi.org/10.3389/fvets.2021.684295

Liu, C., Wang, C., Zhang, J., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Pei, C. X., Chen, L., & Zhang, Y. L. (2021). Guanidinoacetic acid and betaine supplementation have positive effects on growth performance, nutrient digestion and rumen fermentation in Angus bulls. *Animal Feed Science and Technology*, *276*, 114923. https://doi.org/doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114923

Liu, H., Yang, G., Degen, A., Ji, K., Jiao, D., Liang, Y., Xiao, L., Long, R., & Zhou, J. (2021). Effect of feed level and supplementary rumen protected lysine and methionine on growth performance, rumen fermentation, blood metabolites and nitrogen balance in growing Tan lambs fed low protein diets. *Animal Feed Science and Technology*, *279*, 115024. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.115024

Liu, Y. J., Chen, J. Z., Wang, D. H., Wu, M. J., Zheng, C., Wu, Z. Z., Wang, C., Liu, Q., Zhang, J., Guo, G., & Huo, W. J. (2021). Effects of guanidinoacetic acid and

coated folic acid supplementation on growth performance, nutrient digestion and hepatic gene expression in Angus bulls. *British Journal of Nutrition*, *126*(4), 510–517. https://doi.org/10.1017/S0007114520004341

Mauricio, R. M., Mould, F. L., Dhanoa, M. S., Owen, E., Channa, K. S., & Theodorou, M. K. (1999). A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology*, *79*(4), 321–330. https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00033-4

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., & Wilkinson, R. G. (2011). *Animal Nutrition* (Pearson, Ed.; Seventh Edition). Pearson.

Menke, K. H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *The Journal of Agricultural Science*, *93*(1), 217–222. https://doi.org/10.1017/S0021859600086305

Menke, K. H., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, *28*, 7–55.

Michiels, J., Maertens, L., Buyse, J., Lemme, A., Rademacher, M., Dierick, N. A., & de Smet, S. (2012). Supplementation of guanidinoacetic acid to broiler diets: Effects on performance, carcass characteristics, meat quality, and energy metabolism. *Poultry Science*, *91*(2), 402–412. https://doi.org/10.3382/ps.2011-01585

Nabuurs, C. I., Choe, C. U., Veltien, A., Kan, H. E., van Loon, L. J. C., Rodenburg, R. J. T., Matschke, J., Wieringa, B., Kemp, G. J., Isbrandt, D., & Heerschap, A. (2013). Disturbed energy metabolism and muscular dystrophy caused by pure

creatine deficiency are reversible by creatine intake. *Journal of Physiology*, *591*(2), 571–592. https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.241760

National Academies of Sciences, E., & Medicine. (2021). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Eighth Revised Edition*. The National Academies Press. https://doi.org/doi:10.17226/25806

National Research Council. (2007). *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. National Academies Press. https://doi.org/10.17226/11654

Ørskov, E. R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, *92*(2), 499–503. https://doi.org/10.1017/S0021859600063048

Ostojic, S. M. (2015). Advanced physiological roles of guanidinoacetic acid. *European Journal of Nutrition*, *54*(8), 1211–1215. https://doi.org/10.1007/s00394-015-1050-7

Ostojic, S. M. (2016). Guanidinoacetic acid as a performance-enhancing agent. In *Amino Acids* (Vol. 48, Issue 8, pp. 1867–1875). Springer-Verlag Wien. https://doi.org/10.1007/s00726-015-2106-y

Ostojic, S. M., Ratgeber, L., Olah, A., Betlehem, J., & Acs, P. (2020). Guanidinoacetic acid deficiency: a new entity in clinical medicine? *Int J Med Sci*, *17*(16), 2544–2550. https://doi.org/10.7150/ijms.47757

Otto, G., Roehe, R., Looft, H., Thoelking, L., & Kalm, E. (2004). Comparison of different methods for determination of drip loss and their relationships to meat quality and carcass characteristics in pigs. *Meat Science*, *68*(3), 401–409. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.04.007

Owens, F. N., & Basalan, M. (2016). Ruminal fermentation. In D. D. Millen, M. De Beni Arrigoni, & R. D. Lauritano Pacheco (Eds.), *Rumenology* (pp. 63–102).

Springer International Publishing. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-30533-2_3

Pirgozliev, V., Rose, S. P., Mirza, M. W., Whiting, I. M., Malins, H., Bauer, L., & Lemme, A. (2022). Feeding guanidinoacetic acid to broiler chickens can compensate for low dietary metabolisable energy formulation. *British Poultry Science*, *63*(3), 368–374. https://doi.org/10.1080/00071668.2021.2014399

Prieto, N., Roehe, R., Lavín, P., Batten, G., & Andrés, S. (2009). Application of near infrared reflectance spectroscopy to predict meat and meat products quality: A review. *Meat Science*, *83*(2), 175–186. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.04.016

Ren, G., Hao, X., Zhang, X., Liu, S., & Zhang, J. (2022). Effects of guanidinoacetic acid and betaine on growth performance, energy and nitrogen metabolism, and rumen microbial protein synthesis in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, *292*, 115402. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2022.115402

SAGARPA. (2001). *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999, Technical specifications for the production, care, and use of laboratory animals]*. Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

SAGARPA. (2015). *NORMA Oficial Mexicana NOM-033-SAG/ZOO-2014, Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres [Mexican Official Standard NOM-033-SAG/ZOO-2014, Methods for the Slaughter of Domestic and Wild Animals].* (pp. 1–48). Diario Oficial de la Federación. https://www.gob.mx/profepa/documentos/norma-oficial-mexicana-nom-033-sag-zoo-2014-metodos-para-dar-muerte-a-los-animales-domesticos-y-silvestres

Saha, S. K., & Pathank, N. N. (2021). *Fundamentals of animal nutrition*. Springer Singapore. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-15-9125-9

Salah, A. S., Ahmed-Farid, O. A., & El-Tarabany, M. S. (2020). Effects of Guanidinoacetic acid supplements on laying performance, egg quality, liver nitric oxide and energy metabolism in laying hens at the late stage of production. *Journal of Agricultural Science*, *158*(3), 241–246. https://doi.org/10.1017/S0021859620000477

Santos, V. A. C., Silva, S. R., Mena, E. G., & Azevedo, J. M. T. (2007). Live weight and sex effects on carcass and meat quality of “Borrego terrincho–PDO” suckling lambs. *Meat Science*, *77*(4), 654–661. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.05.019

Sañudo, C., Alfonso, M., Sánchez, A., Delfa, R., & Teixeira, A. (2000). Carcass and meat quality in light lambs from different fat classes in the EU carcass classification system. *Meat Science*, *56*(1), 89–94. https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00026-7

SAS Institute. (2002). *SAS (Statistical Analysis System). User’s Guide: Statistics* (9.0).

SAS Institute Inc. (2012). *SAS/STAT® 9.4 User’s Guide*. SAS Institute Inc.

Shi, Y., Mao, X., Cai, M., Hu, S., Lai, X., Chen, S., Jia, X., Wang, J., & Lai, S. (2021). miR-194-5p negatively regulates the proliferation and differentiation of rabbit skeletal muscle satellite cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *476*(1), 425–433. https://doi.org/10.1007/s11010-020-03918-0

Speer, H. F., Grant, M. S., Miesner, M. D., & Titgemeyer, E. C. (2022). Effect of guanidinoacetic acid supplementation on nitrogen retention and methionine methyl group flux in growing steers fed corn-based diets. *Journal of Animal Science*, *100*(10). https://doi.org/10.1093/jas/skac283

Speer, H. F., Pearl, K. A., & Titgemeyer, E. C. (2020). Relative bioavailability of guanidinoacetic acid delivered ruminally or abomasally to cattle. *Journal of Animal Science*, *98*(9), 1–6. https://doi.org/10.1093/jas/skaa282

Stockman, S. L., & Scott, M. A. (2008). *Fundamentals of veterinary clinical pathology* (2nd ed.). Blackwell Publishing.

Szmańko, T., Lesiów, T., & Górecka, J. (2021). The water-holding capacity of meat: A reference analytical method. *Food Chemistry*, *357*, 129727. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129727

Tabatabaei Yazdi, F., Golian, A., Zarghi, H., & Varidi, M. (2017). Effect of wheat-soy diet nutrient density and guanidine acetic acid supplementation on performance and energy metabolism in broiler chickens. *Italian Journal of Animal Science*, *16*(4), 593–600. https://doi.org/10.1080/1828051x.2017.1305260

Tagliapietra, F., Cattani, M., Bailoni, L., & Schiavon, S. (2010). In vitro rumen fermentation: Effect of headspace pressure on the gas production kinetics of corn meal and meadow hay. *Animal Feed Science and Technology*, *158*(3–4), 197–201. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.04.003

Tagliapietra, F., Cattani, M., Hansen, H. H., Hindrichsen, I. K., Bailoni, L., & Schiavon, S. (2011). Metabolizable energy content of feeds based on 24 or 48h in situ NDF digestibility and on in vitro 24h gas production methods. *Animal Feed Science and Technology*, *170*(3–4), 182–191. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.09.008

Tassone, S., Fortina, R., & Peiretti, P. G. (2020). In Vitro Techniques Using the DaisyII Incubator for the Assessment of Digestibility: A Review. *Animals*, *10*(5), 775. https://doi.org/10.3390/ani10050775

Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to

determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, *48*(3–4), 185–197. https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6

Tossenberger, J., Rademacher, M., Németh, K., Halas, V., & Lemme, A. (2016). Digestibility and metabolism of dietary guanidino acetic acid fed to broilers. *Poultry Science*, *95*(9), 2058–2067. https://doi.org/10.3382/ps/pew083

Valini, G. A. da C., Duarte, M. de S., Rodrigues, G. de A., Veroneze, R., Saraiva, A., Hausman, G., & Rocha, G. C. (2020). Guanidinoacetic acid supplementation on growth performance and molecular mechanisms of lean mass gain in nursery pigs. *Ciencia Rural*, *50*(8), 1–8. https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190948

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, *74*(10), 3583–3597. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2

Vazquez-Mendoza, O. V., Andrade-Yucailla, V., Elghandour, M. M. M. Y., Masaquiza-Moposita, D. A., Cayetano-De-Jesús, J. A., Alvarado-Ramírez, E. R., Adegbeye, M. J., Barros-Rodríguez, M., & Salem, A. Z. M. (2023). Effect of Dietary Guanidinoacetic Acid Levels on the Mitigation of Greenhouse Gas Production and the Rumen Fermentation Profile of Alfalfa-Based Diets. *Animals*, *13*(11), 1719. https://doi.org/10.3390/ani13111719

Vazquez-Mendoza, O. V., Elghandour, M. M. M. Y., Mariezcurrena Berasain, M. A., Inyang, U. A., Jack, A., Lackner, M., & Salem, A. Z. M. (2024). Guanidinoacetic acid effects on ruminal fermentation, digestibility and methane production in sheep liquor: Dose-response analysis. *Journal of Agriculture and Food Research*, *18*, 101540. https://doi.org/10.1016/j.jafr.2024.101540

Vraneš, M., Ostojić, S., Tot, A., Papović, S., & Gadžurić, S. (2017). Experimental and computational study of guanidinoacetic acid self-aggregation in aqueous

solution. *Food Chemistry*, *237*, 53–57. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.088

Wang, C., Liu, C., Zhang, G. W., Du, H. S., Wu, Z. Z., Liu, Q., Guo, G., Huo, W. J., Zhang, J., Pei, C. X., Chen, L., & Zhang, S. L. (2020). Effects of rumen-protected folic acid and betaine supplementation on growth performance, nutrient digestion, rumen fermentation and blood metabolites in Angus bulls. *British Journal of Nutrition*, *123*(10), 1109–1116. https://doi.org/10.1017/S0007114520000331

Wang, J., Zhang, Y., Wang, X., Li, F., Zhang, D., Li, X., Zhao, Y., Zhao, L., Xu, D., Cheng, J., Li, W., Lin, C., Yang, X., Zhai, R., Zeng, X., Cui, P., Ma, Z., Liu, J., Zhang, X., & Wang, W. (2022). Association between rumen microbiota and marbling grade in Hu sheep. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.978263

Wang, L. S., Shi, B. M., Shan, A. S., & Zhang, Y. Y. (2012). Effects of Guanidinoacetic Acid on Growth Performance, Meat Quality and Antioxidation in Growing-Finishing Pigs. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, *11*(5), 631–636. https://doi.org/10.3923/javaa.2012.631.636

Wyss, M., & Kaddurah-Daouk, R. (2000). Creatine and Creatinine Metabolism. *Physiological Reviews*, *80*(3), 1107–1213. https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.3.1107

Yan, Z., Yan, Z., Liu, S., Yin, Y., Yang, T., & Chen, Q. (2021). Regulative Mechanism of Guanidinoacetic Acid on Skeletal Muscle Development and Its Application Prospects in Animal Husbandry: A Review. In *Frontiers in Nutrition* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. https://doi.org/10.3389/fnut.2021.714567

Zhang, J. H., Li, H. H., Zhang, G. J., Zhang, Y. H., Liu, B., Huang, S., Guyader, J., & Zhong, R. Z. (2022). Supplementation of guanidinoacetic acid and rumen-protected methionine increased growth performance and meat quality of Tan

lambs. *Animal Bioscience*, *35*(10), 1556–1565. https://doi.org/10.5713/ab.22.0008

Zhang, S., Yimamu, M., Ma, C., Pan, J., Wang, C., Cai, W., & Yang, K. (2025). Dietary guanidinoacetic acid supplementation improves rumen metabolism, duodenal nutrient flux, and growth performance in lambs. *Frontiers in Veterinary Science*, *12*. https://doi.org/10.3389/fvets.2025.1528861

Zhang, S., Zang, C., Pan, J., Ma, C., Wang, C., Li, X., Cai, W., & Yang, K. (2022). Effects of dietary guanidinoacetic acid on growth performance, guanidinoacetic acid absorption and creatine metabolism of lambs. *PLOS ONE*, *17*(3), e0264864. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264864

11. Anexo 1. Constancias en participación de congresos.

Participación capítulo de libro:

Datos del libro: Aportes científicos para la producción de carne y leche

- **Título del capítulo:** El ácido guanidinoacético como aditivo alimenticio para la engorda de rumiantes
- **Autores:** Óscar Vicente Vázquez-Mendoza, Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem, Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour, María Antonia Mariezcurrena-Berasain
- **Año de publicación:** octubre de 2023
- **Editorial:** Astra editorial.
- **ISBN**: 978-84-19799-89-0

18

El ácido guanidinoacético como aditivo alimenticio para la engorda de rumiantes

Oscar Vicente Vazquez-Mendoza[1]
Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem[2]
Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour[3]
María Antonia Mariezcurrena-Berasain[4]

[1] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México. ORCID 0000-0002-2751-5480
[2] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México. Corresponding author: E-mail: salem@uaemex.mx. ORCID 0000-0001-7418-4170
[3] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México. ORCID 0000-0002-9237-9251
[4] Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México. ORCID 0000-0002-7991-0175

Participación en congreso:

Datos del trabajo presentado:

- **Título del trabajo:** Effect of guanidinoacetic acid on in vitro fermentation and methane production of fattening lambs' diets
- **Autores:** Oscar Vicente Vazquez-Mendoza, Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour, Maria Antonia Mariezcurrena Berasain, José Cedillo Monroy, Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem
- **Congreso:** 17th International Scientific Research Congress (17. Uluslararası Bilimsel Araştırmalar Kongresi)

- **Fecha:** 19 - 20 de agosto de 2023
- **Ubicación:** Ankara, Turquía
- **ISBN del libro de resúmenes:** 978-625-6861-42-8
- **Editor del libro:** Prof. Dr. Bahri Bayam



Makale id= 99

Sözlü Sunum

ORCID ID:

Effect of guanidinoacetic acid on in vitro fermentation and methane production of fattening lambs' diets

Oscar Vicente Vazquez-Mendoza[1], Mona Mohamed Mohamed Yasseen Elghandour[1], Maria Antonia Mariezcurrena Berasain[1], José Cedillo Monroy[2], Abdelfattah Zeidan Mohamed Salem[1]

[1]Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México

[2]Centor Universitario-Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, Estado de México, México

*Corresponding author: salem@uaemex.mx (Abdelfattah Z.M. Salem).

Abstract: Guanidinoacetic acid (GAA) is an endogenic precursor of creatine and can be used as feed additive to improve lamb performance. Unprotected synthetic GAA could be degraded in rumen and affect the ruminal fermentation. The aim of this study was determinate the effect of GAA increasing doses (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 mg/g) on in vitro gas production (GP) and parameters of production kinetic of total gas, methane (CH4), carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H2S). A feedlot lamb diet was incubated for 48-h for the six levels of GAA. Gas production was measured with a pression transductor and CH4 was measured at the same time with a gas detector. Parameter of production kinetics were calculated applied a no lineal equation. The data were analyzed in a completely randomized design, with GAA dosage and incubation time as fixed effects. A regression analysis was applied to determinate the lineal, quadratic or cubic effect of GAA levels. The accumulated gas production was not affected by the GAA levels ($p = 0.260$). The interaction GAA × time was significative ($p = 0.023$) for accumulated CH4 production at 30 and 48 h post incubation. There was no effect of GAA on accumulated CO ($p = 0.227$) and H2S ($p = 0.734$) production. The lag phase of GP was altered ($p = 0.042$) by GAA dosages and the effect was cubic ($p = 0.013$). The addition of GAA effected ($p = 0.021$) CH4 production constant rate and the effect was lineal ($p = 0.004$). The CO and H2S parameters of production kinetic were not affected for GAA addition. In conclusion the addition of GAA to feedlot lamb diet affects some parameters of gas production kinetic and CH4.

Keywords: Creatine, Rumen degradation, Production kinetic, Additives