

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**RELAÇÃO ÓTIMA DE AMINOÁCIDOS SULFURADOS  
EM DIETAS COM REDUÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA  
PARA FRANGOS DE CORTE**

**Audasley Tadeu Santos Fialho**

Zootecnista

**2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**RELAÇÃO ÓTIMA DE AMINOÁCIDOS SULFURADOS**  
**EM DIETAS COM REDUÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA**  
**PARA FRANGOS DE CORTE**

Audasley Tadeu Santos Fialho

**Orientadora: Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura**

**Coorientador: Dr. Juliano Cesar De Paula Dorigam**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2023

D  
I  
S  
S.  
  
/  
  
F  
I  
A  
L  
H  
O  
  
A.  
T.  
S.  
  
2  
0  
2  
3

D  
I  
S  
S.  
  
/  
  
F  
I  
A  
L  
H  
O  
  
A.  
T.  
S.  
  
2  
0  
2  
3

F438r	<p>Fialho, Audasley Tadeu Santos</p> <p>Relação ótima de aminoácidos sulfurados em dietas com redução de proteína bruta para frangos de corte / Audasley Tadeu Santos Fialho. -- Jaboticabal, 2023</p> <p>47 f. : il., tabs.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Nilva Kazue Sakomura</p> <p>Coorientador: Juliano Cesar De Paula Dorigam</p> <p>1. Cistina. 2. Excreção de nitrogênio. 3. Metionina. 4. Redução de proteína bruta. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

## **REGISTRO DO IMPACTO ESPERADO NA SOCIEDADE DA DISSERTAÇÃO**

Os resultados demonstraram uma alternativa viável para reduzir o custo das rações, e uso de farelo de soja em dietas de frangos de corte, por meio da inclusão de aminoácidos sintéticos, conseqüentemente, reduzindo o nível de proteína bruta das rações, sem prejudicar o desempenho das aves. Impactando diretamente na excreção de nitrogênio, trazendo benefícios para o meio ambiente.

## **REGISTRATION OF THE EXPECTED IMPACT ON THE DISSERTATION SOCIETY**

The results demonstrated a viable alternative to reduce the cost of feeds, and the use of soybean meal in broiler diets, through the inclusion of synthetic amino acids, consequently, reducing the level of crude protein in the feeds, without impairing the performance of the feeds birds. Directly impacting nitrogen excretion, bringing benefits to the environment.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RELAÇÃO ÓTIMA DE AMINOÁCIDOS SULFURADOS TOTAIS EM DIETAS COM REDUÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA PARA FRANGOS DE CORTE

**AUTOR: AUDASLEY TADEU SANTOS FIALHO**  
**ORIENTADORA: NILVA KAZUE SAKOMURA**  
**COORIENTADOR: JULIANO CESAR DE PAULA DORIGAM**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Nutrição Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. NILVA KAZUE SAKOMURA (Participação Presencial)  
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. CLAUDSON OLIVEIRA BRITO (Participação Presencial)  
Universidade Federal de Sergipe / São Cristóvão/SE

Prof. Dr. NEI ANDRÉ ARRUDA BARBOSA (Participação Presencial)  
Departamento de Nutrição Animal / Evonik Degussa Brasil e Nutrição de Monogástricos - São Paulo/SP

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2023

Documento assinado digitalmente  
gov.br CLAUDSON OLIVEIRA BRITO  
Data: 03/07/2023 20:17:53-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
gov.br NEI ANDRÉ ARRUDA BARBOSA  
Data: 04/07/2023 22:36:57-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

Audasley Tadeu Santos Fialho, filho de Adisio Pereira Fialho e Fabiana Santos Sousa, nascido no dia 01 de março de 1994 em Cuité, Paraíba. É Técnico Agrícola com Habilitação em Agropecuária, pela Universidade Federal da Paraíba – Colégio Agrícola Vidal de Negreiros no ano de 2013. No ano de 2016 na Universidade Federal de Sergipe – campus do Sertão ingressou no curso de Zootecnia, finalizando a graduação no ano de 2021. Neste período, foi bolsista de iniciação científica PIBIC nos períodos de 2017, 2018 e 2020, sob orientação dos professores doutores Cláudio Jose Parro de Oliveira e Valdir Ribeiro Junior respectivamente. Iniciou o curso de Mestrado em Ciência Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – campus de Jaboticabal, São Paulo, no dia 02 de agosto de 2021, sob orientação da Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura, defendendo sua dissertação no dia 23 de fevereiro de 2023.

Eu sou verso, poema, sou canção  
Sou nordestinamente brasileiro  
Sou da terra de Jackson do pandeiro  
Discípulo do mestre rei do baião  
Eu sou voz, melodia, sou paixão  
De um povo que canta sua gente  
Um vaqueiro que faz o seu repente  
Aboiando as coisas do sertão  
Eu sou verso, poema, sou canção  
Sou nordestinamente brasileiro

Eu cresci com cuscuz e mungunzá  
Carne de sol no óleo e arroz de leite  
Minha mesa nem teve muito enfeite  
Se comia o que dava pra comprar  
Era bolo de milho e de fubá  
Malassada com ovo e com biju  
Minha boca dormente do imbú  
E a canjica esfriando no fogão  
Eu sou verso, poema, sou canção  
Sou nordestinamente brasileiro

Joguei bila e brinquei de peão  
Soltei pipa, atirei de baladeira  
Meu carrinho era uma roladeira  
Era o rei na polícia e ladrão  
Fui he-men, super homem, fui sanção  
Com as meninas da rua era o artista  
Pêra, uva, maçã, salada mista  
Desde novo muié foi perdição  
Eu sou verso, poema, sou canção  
Sou nordestinamente brasileiro

**[Niedson Lua]**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa titulação à minha família, por nunca deixar de acreditar que seria capaz de realizá-lo, por todo carinho, compreensão e suporte.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Veterinárias e Agrárias (FCAV), Campus de Jaboticabal, por ter me acolhido para realização do mestrado.

A CAPES pela bolsa de estudo concedida. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Evonik pelo apoio com análises e aminoácidos para a condução da pesquisa e resultados.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilva Kazue Sakomura pela orientação e confiança, por ajudar no meu crescimento pessoal e profissional, e incentivo para a realização de todo o trabalho.

Ao Dr. Juliano César de Paula Dorigam, Evonik, pela ideia da pesquisa, coorientação e pelos ensinamentos, apoio, paciência e confiança.

À Dr<sup>a</sup>. Letícia Grazielle Pacheco, Biorigin, pela colaboração da ideia da pesquisa com Dr. Juliano, pelos ensinamentos que forma inúmeros, principalmente paciência por passar seu conhecimento durante todo o período e confiança.

Aos membros da banca de defesa de projeto (Dr. Matheus de Paula Reis, Pós. Doc. Laboratório de Ciências Avícola da UNESP de Jaboticabal, e Dr<sup>a</sup>. Juliana Célia Denadai, do Departamento de Biociências da UNESP de Botucatu) por toda discussão e orientação de condução experimental para que conseguíssemos os melhores resultados.

Aos membros da banca de qualificação (Prof. Dr. Marcos Macari, Dr. Danilo Alves Marçal, Pós. Doc. Laboratório de Suinocultura da UNESP de Jaboticabal e Dr<sup>a</sup>. Letícia Grazielle Pacheco, Biorigin), por toda troca de conhecimentos durante todo o processo.

Aos membros da banca de defesa (Prof. Dr. Claudson Oliveira Brito, Universidade Federal de Sergipe e Dr. Nei André Arruda Barbosa, Evonik) por toda compreensão, discussão e colaboração para melhorar o conteúdo aqui escrito e conhecimento adquirido.

Aos meus ex- orientadores da graduação (Prof. Dr. Claudio Jose Parro de Oliveira e Prof. Dr. Valdir Ribeiro Júnior), da Universidade Federal de Sergipe, campus do Sertão, por todo apoio e incentivo desde o primeiro contato com ambos e sempre poder contar com o apoio e carinho de vocês.

Aos membros do LAVINESP: Rony, Bruno, Raully, Gabriel, Rosiane, Damilola, Guilherme, Larissa, Bárbara, Matheus, Lucas, Camila, Bia, Breno, Victor e Mateus.

Aos funcionários do aviário: Antônio e Carlos pela ajuda durante os experimentos, nossas invenções e gambiarras de última hora e pela amizade.

A Rony, por toda paciência, amizade, apoio, por milhares de vezes que atrapalhei o que você estava fazendo para discutir assuntos relacionados a minha pesquisa e meus pensamentos, e você direcionava da melhor maneira e foi assim que conseguimos descrever os melhores resultados. Como sempre disse você é doido.

A Kadoshe e Daniel, que me deram suporte assim que cheguei em Jaboticabal e por mais de 8 meses de convivência.

Aos meus amigos-irmãos (Hiago, Tercio e Phelipe), que desde 1994 construímos essa amizade, e por todo incentivo minhas decisões.

Aos meus pais (Adisio e Fabiana), por todo puxão de orelha, por toda palavra de carinho, incentivo, amor, por sempre acreditar que seria possível realizar meus sonhos e suporte desde sempre, meu muito obrigado, e amo vocês.

Ao meu irmão (Júnior), por todo apoio e por ter colaborado comigo durante todo o percurso.

Aos meus avôs maternos (Marileide e Edivaldo), por tudo que fizeram e faz na minha vida. A minha bisavó (Severina), por todo carinho e amor.

A minha companheira de vida (Brena) por toda paciência, amor e carinho, durante esse tempo, sei que não é fácil a ausência em virtude da responsabilidade mais, vamos vencendo cada batalha.

Aos melhores presentes que a vida poderia me proporcionar meus filhos (Bernardo e Bento), por todo carinho e amor.

Por fim, para todos as demais pessoas que passaram e contribuíram para que eu pudesse concluir mais uma etapa na minha vida.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



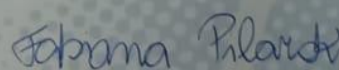
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Eficiência e incorporação de metionina e cistina em frangos de corte em ensaios de dose resposta e isótopos estáveis**", protocolo nº 2053/21, sob a responsabilidade do Profa. Dra. Nilva Kazue Sakomura, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 19 de agosto de 2021.

Vigência do Projeto	05/08/2021 a 05/08/2023
Espécie / Linhagem	<i>Gallus gallus domesticus</i> / Cobb 50
Nº de animais	1500
Peso / Idade	40g / 1 dia - 2.900g/42
Sexo	Machos
Origem	Incubatório Pluma agroavícola — Descalvado- SP

Jaboticabal, 19 de agosto de 2021.

  
**Profa. Dra. Fabiana Pilarski**  
 Coordenadora – CEUA

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1</b> .....	xvii
<b>CONSIDERAÇÃO INICIAIS</b> .....	18
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
<b>2.1 Redução de Proteína em dietas de frangos</b> .....	19
<b>2.3. Aminoácidos Sulfurados</b> .....	21
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	24
<b>Capítulo 2: Optimal ratio of methionine and cystine for performance and nitrogen balance in growing chickens fed low protein diet</b> .....	27
<b>ABSTRACT</b> .....	28
<b>INTRODUCTION</b> .....	29
<b>MATERIALS AND METHODS</b> .....	31
<b>RESULTS</b> .....	33
<b>DISCUSSION</b> .....	35
<b>CONCLUSION</b> .....	39
<b>REFERENCES</b> .....	40

## RELAÇÃO ÓTIMA DE AMINOÁCIDOS SULFURADOS EM DIETAS COM REDUÇÃO DE PROTEÍNA BRUTA PARA FRANGOS DE CORTE

**RESUMO** – O crescimento da produção de frangos de corte vem sendo superável a cada ano, no entanto, alguns pontos têm sido bastante debatidos. Na questão nutricional a redução da proteína bruta sem prejudicar o desempenho dos frangos de corte. Órgãos e entidades pressionam o sistema de produção em questão socioambiental uma vez que o nitrogênio excretado pelas aves tem um potencial poluidor. Tradicionalmente as dietas praticadas no Brasil tendem a não atender a exigência de aminoácidos sulfurados, requerendo assim a suplementação de aminoácidos cristalinos. Logo, o objetivo deste estudo foi determinar a relação ótima de metionina (Met) e cistina (Cis) na exigência de aminoácidos sulfurados em dietas com redução de proteína bruta. Foi conduzido um ensaio de desempenho, com 1200 frangos de corte macho da linhagem Cobb 500®, distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (10 tratamentos x 6 repetições), com idade entre 14 e 28 dias alimentados com dez rações, com dois níveis de proteína bruta (PB) 21,5% e 19,5% e cinco relações entre os aminoácidos Met:Cis (42:58; 46:54; 50:50; 54:46; 58:42). As rações foram formuladas por meio da inclusão dos aminoácidos DL-metionina e L-cistina, para atender o nível de 0,62% Met+Cis. As variáveis resposta avaliadas foram ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração. Arelado foi realizado um ensaio metabólico para avaliar o balanço de nitrogênio dos aminoácidos sulfurados, utilizando 36 machos da linhagem Cobb 500®. Distribuídos em delineamento inteiramente casualizado (6 tratamentos x 6 repetições), as aves foram alojadas em gaiolas metabólicas individualmente, sendo dois níveis de PB (21,5% e 19,5%) e três relações entre Met:Cis (42:58; 50:50; 58:42). As excretas foram coletadas todos os dias, armazenadas em freezer. Este estudo pretende promover o melhor entendimento da relação ideal de metionina e da cistina nas dietas de frangos de corte com idade de 14 a 28 dias, sobre redução proteína bruta.

**Palavras-chave:** Cistina, excreção de nitrogênio, metionina, redução de proteína bruta

## OPTIMUM RATIO OF SULPHURY AMINO ACIDS IN DIETS WITH REDUCED CRUDE PROTEIN FOR BROILER CHICKENS

**ABSTRACT** - The growth in the production of cut chickens has been surpassed each year, however, some points have been much debated. In terms of nutrition, the reduction of crude protein without impairing the performance of broilers. Bodies and entities put pressure on the production system in socio-environmental issues, since the nitrogen excreted by birds has a polluting potential. Traditionally, diets practiced in Brazil tend not to meet the requirement of sulfur amino acids, thus requiring crystalline amino acid supplementation. Therefore, the objective of this study was to determine the optimal ratio of methionine (Met) and cystine (Cis) in the requirement of sulfur amino acids in diets with reduced crude protein. A performance trial was conducted with 1200 male broiler chickens of the Cobb 500® lineage, distributed in a completely randomized design (10 treatments x 6 repetitions), aged between 14 and 28 days fed with ten diets, with two levels of crude protein (PB) 21.5% and 19.5% and five ratios between Met:Cys amino acids (42:58; 46:54; 50:50; 54:46; 58:42). The rations were formulated through the inclusion of the amino acids DL-methionine and L-cystine, to meet the level of 0.62% Met+Cis. The response variables evaluated were weight gain, feed conversion and feed intake. Attached, a metabolic assay was carried out to evaluate the nitrogen balance of sulfur amino acids, using 36 males of the Cobb 500® strain. Distributed in a completely randomized design (6 treatments x 6 repetitions), the birds were individually housed in metabolic cages, with two CP levels (21.5% and 19.5%) and three Met:Cis ratios (42:58; 50:50; 58:42). Excreta were collected every day and stored in a freezer. This study aims to promote a better understanding of the ideal ratio of methionine and cystine in diets for broiler chickens from 14 to 28 days, on crude protein reduction.

**Keywords:** Cystine, nitrogen excretion, methionine, low protein



## Capítulo 1

## CONSIDERAÇÃO INICIAIS

### 1. INTRODUÇÃO

Inovações tecnológicas são o que impulsionam o crescimento da avicultura de corte. Dentro da escala de produção de frangos de corte, há diversos pontos a serem considerados, entre eles: redução do custo da ração, redução da excreção de nitrogênio e amônia, bem como estabelecer estratégias nutricionais para melhorar a utilização dos aminoácidos sintéticos.

Na produção de frangos de corte, a alimentação é um dos itens mais caros a ser considerado, porém, também uma das áreas mais acessíveis para otimização de custos tornando a atividade mais sustentável. Para otimizar o custo com a alimentação, é necessário entender melhor as exigências nutricionais das aves, e considerar as diferenças na composição nutricional e energética dos ingredientes, para desenvolver estratégias de formulação mais eficientes (Tavernari et al., 2014).

Uma das estratégias usadas pelos nutricionistas para obter formulações de dietas mais eficientes é a redução da proteína bruta em dietas de frangos de corte. A redução da proteína bruta é possível pelo o uso do conceito de proteína ideal, que consiste em atender sem excessos nem deficiências as necessidades de todos os aminoácidos requeridos para manutenção e produção da ave, favorecendo assim deposição proteica com máxima eficiência. Além disso, o conceito estabelece que as exigências dos aminoácidos deve ser relacionado à um aminoácido referência, neste caso a lisina, sendo que esta relação permaneceria de certa forma constante nos diversos cenários de produção. A aplicação desse conceito ganhou destaque principalmente após o início da comercialização de aminoácidos sintéticos para uso na alimentação.

Dentre os aminoácidos cristalinos de maior importância para as aves, a metionina (Met) se destaca por ser o primeiro aminoácido limitante na dieta de aves quando a principal fonte de proteína é farelo de soja, além de ser responsável pelo início da síntese de proteína. Tradicionalmente as rações de

frangos de corte são formuladas para atender à exigência total dos aminoácidos sulfurados, ou seja, pela soma total de Met e Cis na dieta. Essa prática tem sido usada com base na suposição de que Met dietética é convertida em Cys para atender à exigência de aminoácidos sulfurados (Warnick & Anderson, 1968; Silva et al., 1999). Diante dessa suposição, as dietas para frangos de corte são suplementadas com Met para atender à exigência de aminoácidos sulfurados, no entanto, o excesso de Met em relação à sua necessidade para ótima deposição nos tecidos irá resultar no aumento da excreção de nitrogênio (D'Mello, 1994).

De acordo com Gates (2000), o uso de rações com níveis reduzidos de PB, suplementadas com aminoácidos essenciais, permite reduzir a excreção de nitrogênio pelas aves. Isto ocorre devido a um melhor aproveitamento dos aminoácidos promovendo maior deposição de proteína corporal. Pacheco et al., (2018), determinaram a melhor relação (52:48) de aminoácidos sulfurados para frangos de corte com idade entre 14 e 28 dias com níveis de PB ideal para fase de crescimento. Ao reduzir o nível de PB poderia acarretar diferenças na relação de aminoácidos sulfurados (ASS).

Neste contexto, objetivou-se com este trabalho determinar a relação ótima entre metionina e cistina que atenda as exigências de aminoácidos sulfurados totais de frangos de corte, em dietas com redução de proteína bruta.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Redução de Proteína em dietas de frangos**

Existe crescente pressão para a redução da excreção de nitrogênio advindo do sistema de produção de frangos de corte. Uma das estratégias é formular dietas de frangos de corte reduzindo a proteína bruta. Na prática a redução de proteína é feita através da inclusão de aminoácidos cristalinos na dieta em que aparecem limitantes na dieta e, além disso, a redução deve ser suficiente para que não haja perda de desempenho das aves e que reduza a excreção de nitrogênio de forma significativa.

No entanto, é preciso considerar as exigências dos aminoácidos e atentar-se à ordem de limitação de aminoácidos na dieta, uma vez que, ao reduzir a proteína bruta, os aminoácidos deficientes devem ser atendidos por meio da suplementação dietética de aminoácidos sintéticos para evitar perda no desempenho dos animais.

Essa redução é possível na formulação de rações para frangos, quando utilizado o conceito de proteína ideal, reduzindo o nível proteico da ração para reduzir a excreção de nitrogênio, permitir um menor custo nas dietas, sem afetar o desempenho dos frangos de corte. A proteína ideal, é representada pela proteína balanceada, cujo princípio é o atendimento das exigências com base na relação ideal entre os aminoácidos essenciais e a lisina. (Grana, 2008; Cerrate e Corzo, 2019).

Os aminoácidos cristalinos viabilizaram a redução dos teores de proteína bruta das dietas, em virtude da sua alta digestibilidade, da facilidade e disponibilidade da inclusão destes na dieta, e permitir a redução no incremento calórico (Toledo et al. 2004). Segundo Cella et al. (2009) a suplementação de aminoácidos cristalinos possibilita um melhor balanço entre os aminoácidos essenciais. As rações formuladas com base nos aminoácidos digestíveis e no perfil de proteína ideal, diminuem as perdas de nitrogênio nas excretas.

Dietas de frangos de corte com alto teor de proteína bruta sobrecarregam o sistema de digestão, diminui absorção e aumenta a eliminação de nitrogênio não aproveitável, onde, acarreta um alto valor de gasto de energia (Bertechini, 2006). Para a incorporação de um aminoácido na cadeia proteica há um custo metabólico de, aproximadamente em 4mol de ATP, no entanto, o excesso não é usado para síntese proteica, e como as aves não tem capacidade de estocar esse excesso por longo período, são catabolizados, requerendo um alto custo metabólico para excretar nitrogênio estimado aproximadamente entre 6 e 18mol de ATP, esse custo elevado gera redução da eficiência alimentar, aumento no desperdício de nutrientes e, principalmente, maior excreção de nitrogênio no ambiente (Mcleod, 1997; Moughan, 2003).

Pesquisas demostram que é possível a redução da proteína bruta (PB) das dietas de frangos de corte, por meio da suplementação de aminoácidos cristalinos sem alterar o desempenho e características de carcaça de frangos,

além de reduzir a excreção de nitrogênio (Aletor et al., 2000; Faria Filho, 2006 e 2007). Um estudo realizado por Wang et al. (2001), demonstrou que a adição de aminoácidos essenciais em rações de frangos de corte com redução de proteína bruta de 22% para 17,5%, não comprometeu o desempenho animal.

Trabalhos demonstram que as aves retêm apenas 45% do nitrogênio ingerido na forma de proteína, o residual é excretado. Um decréscimo de 1% de PB na dieta, implica em uma redução de 7% até 10% do nitrogênio excretado (Cauwenberghe e Burnham, 2001; Faria Filho et al. 2006). Esses resultados corroboram com o encontrado por (Rostagno *et al.* 2007), que ao suplementar aminoácidos nas dietas de não ruminantes, reduz a excreção de nitrogênio em 8,5% por 1% de proteína bruta reduzida em dietas para frangos de corte.

Manipular a relação de aminoácidos sulfurados (metionina + cistina) e treonina na dieta, diminuíram a excreção de nitrogênio sem prejudicar o desempenho, confirmando que a relação deve ser balanceada para que não ocorra uma maior excreção de nitrogênio. Por outro lado, a melhor utilização de todos os aminoácidos para acréscimo e manutenção de proteína é quando estão na exigência ideal ou ligeiramente abaixo um pouco abaixo da exigência de manutenção e crescimento, aumenta a eficiência de utilização dos aminoácidos em dietas com proteína bruta reduzida (Corzo et al. 2005).

### **2.3. Aminoácidos Sulfurados**

Na maioria dos empreendimentos avícolas, as dietas brasileiras são formuladas e produzidas à base de milho e farelo de soja, ambos ingredientes não são suficientes para atender as exigências dos aminoácidos sulfurados requeridos pelas aves. De acordo com Brosnan e Brosnan, (2006) os aminoácidos sulfurados (SAA) são compostos pela: metionina (Met), Cistina (Cis), homocisteína e taurina, no entanto, somente as duas primeiras são incorporadas às proteínas e o atendimento dos requisitos nutricionais de aminoácidos sulfurados é representado pela (Met:Cis) e tem em sua estrutura química o elemento enxofre, sendo esse, o responsável por diferenciá-los dos demais aminoácidos envolvidos na síntese de proteína animal.

A metionina é o aminoácido essencial que aparece como o primeiro limitante exigido pelas aves e atua na biossíntese de outras substâncias tais como: melatonina, creatina, epinefrina, colina, poliaminas e carnitina, além de desempenhar uma importante função como doador de grupos metil (Baker,

1994; Rademacher, 2001). A cistina é um aminoácido sulfurado, resultante da transsulfuração da metionina e mediado pela da oxidação da cisteína. A Cis é classificada como um aminoácido condicionalmente essencial, porém, fundamental no desenvolvimento das penas e tecidos queratina das aves (Stilborn et al. 1997).

A exigência da metionina digestível em decorrência da idade é reduzida e tende a ter um comportamento linear decrescente (Fisher et al. 1981 e Stilborn, 1997). Por outro lado, a exigência da cistina é crescente com a idade, sendo maior em torno de 20 a 30 dias, justificado pela síntese de queratina na substituição de penugem por penas (Mitchell, 1964).

A cistina é o produto de oxidação da cisteína e encontrado em diversas proteínas estruturais, principalmente em penas, mas também em enzimas digestíveis (Champe et al. 2006). O metabolismo dos aminoácidos sulfurados é complexo, sendo o fígado o principal órgão para sua metabolização. O metabolismo dos AAS envolve diversos compostos biológicos (figura 1) e reações de transsulfuração, transmetilação e remetilação (Oliveira Neto, 2014).

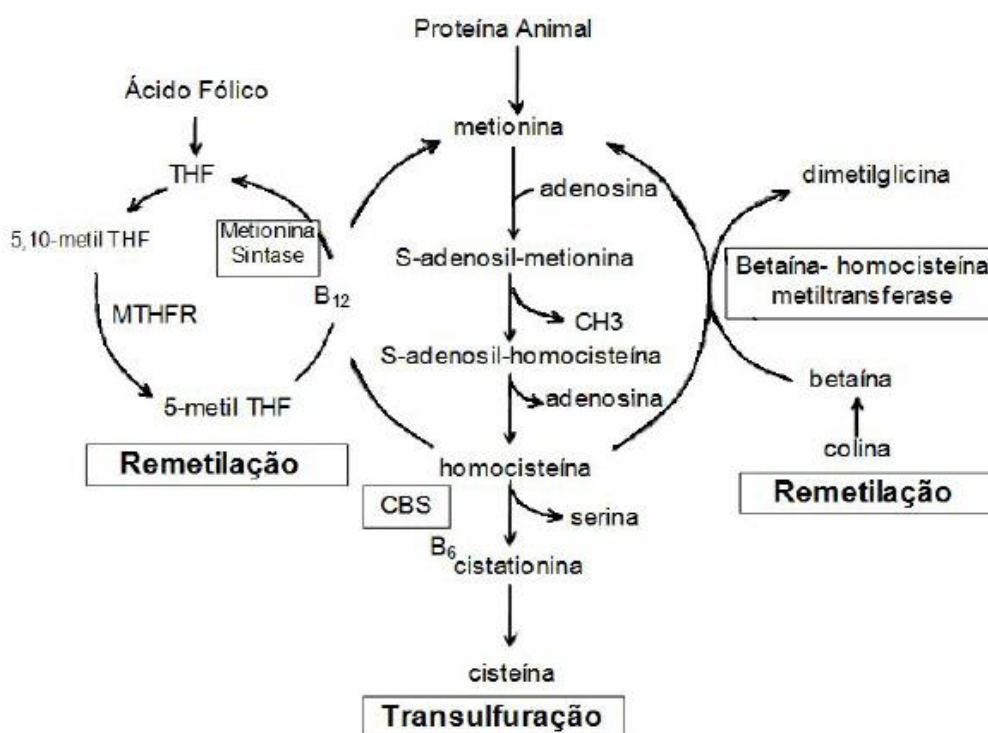


Figura 1: Metabolismo da Metionina, modificada de Haynes, 2002

Caso não ocorra a necessidade da metionina ser convertida a homocisteína pode ser transformada a serina via dependente da vitamina B6 e

produzir a cistationa por meio da via de transsulfuração, formando a cisteína e  $\alpha$ -cetobutirato. A molécula de cisteína é muito instável e pode ser facilmente oxidada no seu dímero, a cisteína forma ligações dissulfeto com outra molécula de cisteína para formação de uma Cistina (Lehninger e Nelson, 2011).

Pouco se sabe sobre a proporção ideal de Met:Cis em relação aos aminoácidos sulfurados (SAA) para frangos de corte e especialmente com relação a dietas com baixo teor de PB, conseqüentemente a Met pode ser fornecida em excesso para favorecer promover a síntese de Cis, para atender à exigência de ambos os aminoácidos. Desta forma, esta suposição poderia induzir redução na eficiência com que a Met é utilizada diretamente pelo organismo (Pacheco et al. 2018).

Rodrigues *et al.* (2014) as exigências em aminoácidos sulfurados em dietas de frangos de corte apresentam resultados contraditórios, sendo justificado na maioria das vezes ao uso de rações, com redução ou não ao nível de proteína bruta, assim como a associação da suplementação de DL-metionina e/ou cistina como fonte de aminoácidos sulfurados. No estudo realizado por Pacheco et al. (2018), os resultados sugeriram que a proporção ideal de metionina para cistina (52:48) para máxima performance e que a partir deste ponto a conversão de metionina para cistina é priorizada via transsulfuração.

O fornecimento de rações para frangos de corte suplementadas com L-cistina pode poupar a utilização de Met, e pode aumentar sua disponibilidade no organismo para outras funções metabólicas, incluindo a deposição de proteína corporal (Pacheco *et al.* 2018). Lewis (2003), também relata que a adição de Cis pode melhorar o aproveitamento do Met para a deposição muscular.

Diante do exposto, determinar a relação ótima entre metionina e cistina no requerimento de aminoácidos sulfurados totais em dietas com redução de proteína bruta se torna necessário para melhorar a deposição proteica.

## REFERÊNCIAS

Aletor VA, Hamid II, Nieb E, (2000) Low- protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens : effects on performance, carcass characteristics, Whole body composition and efficiencies of nutrient utilization. **Journal of the Science of Food and Agriculture** v.80, n.5, p.547-554.

Baker DH, HAN Y, (1994) Ideal amino acid profile for chicks during the first three weeks posthatching. **Poultry Science**,73(9), 1441-1447.

Bertechini AG, (2006) Nutrição de Monogástricos, Lavras: Editora UFLA. 2006.

Borges-Santos MD, (2007) **Efeito da suplementação de cisteína ou glutamina sobre o metabolismo dos aminoácidos sulfurados e glutatona de pacientes infectados pelo HIV nas condições de jejum e pós-sobrecarga de metionina.** Tese de doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Brosnan JT, Brosnan ME, (2006) The sulfur-containing amino acids: An overview. **J. Nutr.** 136, 1636S–1640S.

Cauwenberghe SV, Burnham D, (2001) New developments in amino acid and protein nutrition of poultry, as related to optimal performance and reduced nitrogen excretion. In: **EUROPEAN SYMPOSIUM OF POULTRY NUTRITION**, 3, Blankenberge, Belgium. Proceedings... Blankenberge, Belgium.

Cella OS, Murakami AE, Franco JRG, (2009) Níveis de lisina digestível em dietas baseadas no conceito de proteína ideal para frangos de corte na fase inicial, **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.1, p. 101-106.

Champe P, Harvey RF, (2006) DR Bioquímica ilustrada. 3a. ed. Porto Alegre: Artmed.

Corzo A, Fritts C, Kidd M, Kerr B, (2005) Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crud protein diets, **Animal Feed Science and Technology**, v.118, n.3, p. 319-327.

D'Mello JPF, (1994), Amino acids imbalance, antagonisms and toxicities. In: D'Mello, J. P. F. Amino acids in farm animal nutrition. Wallingford: **CAB Internacional**, p. 63-97.

Faria Filho DE, Rosa OS, et al. (2006) Dietas de baixa proteína no desempenho de frangos criados em diferentes temperaturas. **Pesqui. Agropecu. Bras.**, v.41, p.101-106.

Faria Filho DE, Torres KAA, (2007) Proteína ideal para frango de corte. **Revista Aveword**, v.37, n.1, p.58-63.

Fisher ML. et al. (1981) Feather growth and feather composition of broiler chickens. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 61, p. 769-773.

Gates RS, (2000) Poultry diet manipulation to reduce output of pollutants to environment. In: SIMPÓSIO SOBRE RESÍDUOS DA PRODUÇÃO AVÍCOLA, 2000, Concórdia, SC. **Anais...** Concórdia, SC: EMBRAPA, p. 62-74.



- Grana AL (2008), Estratégias nutricionais para frangos de corte. 2008. 102p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975p.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975p., 2011.
- LEWIS AJ, (2003) Methionine–Cystine Relationships in Pig Nutrition, in: Aminoacid in animal nutrition, 2nd edition. Cambridge
- Mcleod M, (1997) Effects of amino acid balance and energy: protein ratio on energy and nitrogen metabolism in male broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 38, p. 405-41.
- Mitchel HH, (1964) Comparative nutrition of man and domestic animal. New York, NY: Academic Press.
- Moughan PJ, (2003) Amino acid availability: aspects of chemical analysis and bioassay methodology. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, n.2, p. 127–141.
- Oliveira Neto (2014) Metabolismo e exigência de metionina. In: Nutrição de não ruminantes. Nilva Kazue Sakomura et al. Jaboticabal: Funep, p.188-189.
- Pacheco LG, Sakomura NK, Suzuki RM, Dorigam JCP, Viana GS, Milgen JV, Denadai JC, (2018) Methionine to cystine ratio in the total sulfur amino acid requirements and sulfur amino acid metabolism using labelled amino acid approach for broilers. **BMC Veterinary Research** 14:364.
- Rademacher M, (2001) Por qué es importante considerar la proporción "mínima" de metionina sobre metionina + cistina total en las dietas de cerdos? Amino News, [S. l.], v.1, n.1, p.7-10.
- Rodrigues, Wop, Garcia RG; Naas IA, Rosa CO, Caldarelli CE (2014) Evolução da avicultura de corte no Brasil. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.10, n.18; p.
- Rostagno HS, Bünzen S, Sakomura NK, Albino LF, (2007) Avanços metodológicos na avaliação de alimentos e de exigências nutricionais para aves e suínos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 295-304.
- Sakomura NK, Rostagno HS, (2016) Métodos de pesquisa em nutrição de monogástricos. 2ª ed, Jaboticabal:Funep.
- Silva, SHM; Albino LFT; Vargas JR JG et al., (1999) Níveis de metionina + cistina para frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.28, n.3, p.519-525.
- Stilborn HL, Moran ET, Gous RM, and Harrison MD, (1997) Effect of Age on Feather Amino Acid Content in Two Broiler Strain Crosses and Sexes. **The Journal of Applied Poultry Research**, 6, 205-209.
- Tavernari FC, Pessôa, Gabriel B, Vieira RA, Albino LFT, (2014) Novos conceitos em nutrição de aves. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.13, n.3, p.755-774 jul./set.

Toledo GS, Lopez J, (2004) Aplicação dos conceitos de proteína bruta e proteína ideal sobre o desempenho de frangos de corte machos e fêmeas criados no inverno. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p. 1924-1931.

Wang S et al, (2001) Uptake of DL-2-hydroxy-4-methylthio-butanoic acid (DL-HMB) in the broiler liver in vivo. **Poultry Science, Champaign**, v. 80, p. 1619-1624.

Warnick RE, Anderson JO, (1968) Limiting essential amino acids in soybean meal for growing chickens and the effects of heat upon availability of the essential amino acids. **Poultry Science**, v.47, p.281-287.

**Capítulo 2: Optimal ratio of methionine and cystine for performance and nitrogen balance in growing chickens fed low protein diet**

## Optimal ratio of methionine and cystine for performance and nitrogen balance in growing chickens fed low protein diet

**ABSTRACT** - The objective of the study was to determine the optimal ratio of methionine (Met) and cystine (Cys) in the requirement of sulfur amino acids in diets with reduced crude protein. Two trials were carried out, in the trial 1 were used 1200 broiler chicks 14 to 28-old-days with a randomly distributed in 60 pens, grouping 20 birds per pen. The treatments result from a factorial arrangement of two protein levels (21.5 and 19.5%) and five Met/SAA levels (42, 46, 50, 54, and 58), totaling ten treatments with six replicated per each. All experimental diets were formulated to meet or exceed the nutritional recommendation (Cobb Vantress, 2018), except for digestible sulfur amino acids (0.62% SID Met+Cys). Trial 2 was used with 36 birds selected. The birds were randomly distributed in six treatments with three replications and individually allocated in metabolic cages to perform the metabolic trail. Supplied the experimental diets from 14 to 28-old-days. The treatments resulted from the factorial arrangement of two levels of protein (21.5 and 19.5%) and three Met/SAA (42, 50, and 58). Experimental diets were the same used in the performance trial. The statistical analyses were performed as two-way ANOVA, The main and interaction effect was compared by Tukey test. All statistical procedures were performed using the PROC GLM and PROC NLIN. Met:Cys/SAA ( $P < 0.05$ ) was shown a significative effect for the BWG. The FI and FCR were significantly affected by interaction ( $P < 0.05$ ). The broken point described the optimum level, where it was revealed that for the 21.5% CP, the BWG was earlier reached (51 Met/SAA) than 19.5%CP that reached 53 Met/SAA. The broken point FCR described the optimum level of 51 Met/SAA, whereas for the higher CP, was of at 53 Met/SAA rate. The CP level affected significantly on the Nin, Nout and kN, where a reduction in the CP released in lower Nin ( $P < 0.05$ ) and consequently on the Nout ( $P < 0.05$ ), nonetheless resulted in an improvement on the kN ( $P < 0.05$ ). Moreover, the CP level did not affect the NR ( $P > 0.05$ ). A CP reduction could be a recommendable tool to reduce the nitrogen excretion without a negative effect on the performance, obtaining a better result with 51:49/SAA improving the FCR when CP-reduced diets are used.

**Keywords:** Cystine, Methionine, Sulfur amino acids, nitrogen excretion, protein reduction

## INTRODUCTION

Protein is one of the main components in feed formulation that need attention, especially from economic and sustainable aspects. Soybean meal is the main protein source in around 90% of poultry diets (Vieira et al., 2014) and can make the feed formulation more expensive (Baker, 2009). Therefore, it has been advantageous for nutritionists to reduce the dietary crude protein (CP) by increasing the crystalline amino acid utilization to reduce feed formulation cost and reducing nitrogen excretion due to diets precisely meeting the animal requirement (Dersjant and Peisker 2011). To apply protein reduction successfully, nutritionists must be careful that amino acids and other nutrients are not limiting so that the performance of birds is not negatively affected. According to the study (W. Lambert et al., 2023), reducing dietary CP by up to 3% points and maintaining crystalline amino acid levels adequately supplied from the diet resulted in similar or better production performance from 10 to 30 days for weight gain, feed intake, feed conversion (FC) and carcass traits, reduced daily water intake and reduced water intake, feed rate, excreted N and moisture, plus reduced litter wetting and injury pedals.

The diets based on corn-soybean meal tend to present a deficiency in sulfur amino acids (SAA) (Ahmed and Abbas 2011, Goulart et al. 2011, Faridi et al. 2016). SAA is essential for maintenance and tissue deposition. In birds, it is necessary for feather growth. According to Williams (1997), around 80% of SAA is supplied by vegetal sources, and the other 20% is from crystalline methionine that is required their supplementation in poultry feeds. Methionine is an essential amino acid crucial to start protein synthesis and is mainly found in lean tissue (Sell et al., 1980). Meanwhile, cystine could be considered a conditionally essential amino acid since it is biosynthesized from methionine (Klasing, 1998, Lehninger, 2011). Cystine is an important component of numerous tissues, such as cartilage and keratinized tissues. Also, in birds, it is the principal amino acid of feathers. Thus, during the feather growth or renovation, the cystine requirement is high, potentially resulting in a higher conversion of methionine via the transsulfuration pathway to fulfilling its requirement (Klasing, 1998). Therefore, it has been assumed in poultry diets that the SAA requirement is met by the sum

of dietary methionine and cystine, and methionine would be sufficient to fulfill the requirement of cystine as well.

In diets with high or normal protein content, the non-essential amino acids can be synthesized from essential amino acids (AAE) (Aftab et al., 2006). Assuming that non-essential amino acid reduction may be a limiting factor in low-protein diets, research has been carried out to study the effects of reducing crude protein in the feed associated with simultaneous supplementation of both essential and non-essential amino acids. (Kerr & Kidd, 1999; Waldroup et al., 2005). Currently, on a commercial scale, the production of the amino acid L-cystine is low, making it difficult to use it in practice. However, reducing the protein and meeting the total sulfur amino acids requirement is possible by supplementing crystalline methionine since it is transsulfur to cystine and other intermediates metabolites. In addition to the possibility of using ingredients that contain a high percentage of cystine.

Doses-responses to determine SAA requirement apply gradual methionine supplementation, disregarding the dietary cystine content or the methionine-cystine ratio (Met:Cys) in each SAA level. Therefore, understanding the metabolic pathway of methionine and considering the cystine requirement make it possible to improve the recommendation for SAA further (Kalinowski et al., 2003). Additionally, higher values of dietary cystine, being above half of SAA, could affect nitrogen retention with negative results on bird's performance (Muramatsu and Okumura, 1979; Webel and Baker, 1999). Some recommendations were proposed about Met/SAA for growing broilers, with a major proportion of methionine being around 53-52% Met/SAA (Baker et al., 1996 and Pacheco et al., 2018), and 55% Met/SAA (Rostagno et al., 2017).

We suspect that with CP reduction and fixing the SAA level, after digestible methionine requirements are satisfied, the sulfur group of methionine above requirement will be efficiently transferred for cystine biosynthesis, improving the nitrogen retention and the bird's performance. In this way, this study aimed to evaluate the effect of Met:Cys to determine the optimum SAA ratio on CP reduction diets.

## MATERIALS AND METHODS

### *Ethical implications*

This experiment was conducted in the Poultry Science Laboratory at the School of Agricultural and Veterinarian Science of the Sao Paulo State University (Unesp). The Ethical Committee of Animal Use (CEUA) approved all procedures and management under protocol n. 2053/21.

### *Birds and management*

A total of 1380 hatched Cobb 500 male broiler chickens were obtained from a local hatchery and allocated in a poultry house with an environmentally controlled system. The birds were reared in floor pens (1.4 x 3.0 m) under temperature control conditions and managed according to the breed guidelines (Cobb Vantress, 2018). The poultry house was equipped with nipple drinkers and one tubular feeder per pen. The light program was set to provide 18L:6D during the all-rearing period.

During the pre-experimental period (1-13-day-old), all birds were fed with a single diet formulated to attend the nutritional recommendation of Rostagno et al. (2017), and water and mash-type feed was *ad libitum*.

### *Experimental design in the performance trial*

At 14-day-old, 1200 broiler chicks with a similar body weight of  $0.651 \pm 0.005$  kg were selected from the initial group and randomly distributed in 60 pens, with 20 birds per pen. The treatments were distributed in a completely randomized design and consisted of two protein levels (21.5 and 19.5%), and five Met:Cys ratios (42:58, 46:54, 50:50, 54:46, and 58:42), totaling ten treatments with six replicated per treatment. All experimental diets were formulated to meet or exceed the nutritional recommendation (Cobb Vantress, 2018), except for digestible sulfur amino acids (0.62% SID Met+Cys), which were marginally reduced (about 0.21% less SID Met+Cys). This reduction guaranteed that the SAA was the first limiting nutrient in all experimental diets and that the response should be based on this nutrient. The different ratios of methionine and cystine for each treatment were obtained by supplying DL-methionine and L-Cystine according to the proposed treatments (Table 1).

Feed weight and body weight (BW) at the beginning of the experiment (14-day-old) and the end of the experimental period (28-day-old) were recorded to calculate body weight gain (BWG) and feed intake (FI) for the period. Mortality was recorded daily to correct FI and feed conversion ratio (FCR).

#### *Experimental design in the nitrogen balance trial*

The nitrogen balance study was conducted in parallel using 36 birds Cobb 500 selected at the nine-day-old and individually allocated in metabolic cages (50 x 50 x 50 cm). The birds were adapted for five days (from nine to 13-old-days) and supplied the experimental diets from 14 to 28-old-days. The treatments were distributed in a completely randomized design consisting of two levels of protein (21.5 and 19.5%) and three Met:Cys ratios (42:58, 50:50, and 58:42), totaling six treatments with six replications. The composition of the experimental diets was the same as that used in the performance trial (Table 1).

During the experimental period, excreta were collected and weighed daily and stored at -4°C in plastic bags. The excreta produced during the period and homogenized and dried in a hot airflow oven at 50°C for 72 h. The dried samples of diets and excreta were sub-sampled and ground for laboratory analyses. The dry matter content was determined in a drying oven at 105°C for six hours. Following to the AOAC method (992.23), and the nitrogen content was determined by the Kjeldahl method.

The nitrogen balance was calculated:

$$NR = N_{in} - N_{out}$$

$$N_{in} = FI \times N_{feed}$$

$$N_{out} = Exc \times N_{exc}$$

$$k_N = \frac{NR}{N_{in}}$$

Where  $N_{in}$  (g/b.d) is the nitrogen intake,  $N_{feed}$  and  $N_{exc}$  (%) are the nitrogen content on the feed and excreta, respectively;  $N_{out}$  (g/b.d) is the excreted nitrogen,  $Exc$  (g/b.d) is the excreta production,  $NR$  (g/b.d) is the nitrogen retention, and  $k_N$  is the efficiency of nitrogen utilization.



### *Statistical analyses*

The statistical analyses were performed as two-way ANOVA, considering the protein level and Met:Cys ratios as variability factors for performance responses (2x5) and nitrogen balance (2x3) trials. The interaction and main effect were compared by Tukey test.

A segmented model (quadratic broken-line) was performed in function of the Met/SAA (from the analyzed SID of Met and SAA values) to determine the optimum ratio between sulfur amino acids. The model used the following structure:

$$Y = \begin{cases} L + U * (R - X)^2, & x < R \\ L, & x \geq R \end{cases}$$

Where Y is the response (BWG or FCR), x is the Met/SAA, L is the plateau value, U is the slope below point R, and R is the optimum level of Met/SAA at the breaking point. Additionally, the parameters of both protein levels (21.5 vs. 19.5) were pair-compared through T-test.

All statistical procedures were performed using the PROC GLM (analyses of variance) and PROC NLIN (non-linear regression analyses) procedures of SAS software (Statistical Analyses System Studio Environment, ODA version, 2022), considering a significative difference of P<0.05.

## **RESULTS**

### *Performance responses*

The performance results of BWG, FCR, and FI are reported in table 2. No significant interaction was observed between protein level and ratio for BWG (P=0.08), but there were interactions when FCR and FI were evaluated (P<0.05). Considering BWG, there is only a significant effect of Met:Cys/SAA (P<0.05) but no impact of CP reduction (P=0.122).

Broiler chickens fed diets that contained up to 50:50/SAA ratios had compromised body weight gain compared to diets with 54:46 ratio (P<0.05). Additionally, the weight was compromised when supplemented with the 42:58/SAA ratio. Also, lower crude protein and lower SAA ratio (42:58/SAA) diets

impact the FCR ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, diets with 21.5% CP supplemented with SAA had 46:54, 50:50, and 54:46 ratios that were not affected ( $P > 0.05$ ). That demonstrated the ratios containing the highest cystine and methionine (42:58; 58:42), respectively. On the other hand, a difference ( $P < 0.05$ ) in the FI was observed when broilers were fed the lowest methionine ratio (42:58). The group with the highest PB level had a reduction in feed intake. The other relationships (46:54; 50:50; 54:46; 58:42) did not differ, regardless of the level of protein used.

#### *Optimum Met:Cys/SAA for the CP levels*

The Met:Cys/SAA optimum ratio was determined by fitting a quadratic broken-line model using BWG and FCR responses in the function of Met:Cys/SAA (analyzed composition in diet - AMINODat 6.0). The regression was performed for each CP level, being significantly fit ( $P < 0.01$ ), as shown in Figure 1. The broken point described the optimum level, where it was revealed that for the 21.5% CP, the BWG was earlier reached (50.7:49.3/SAA) than 19.5%CP that reached (53.2:46.8/SAA). Additionally, the increasing rate of BWG (around 0.001) before the broken point was similar to both CP levels (around 0.001). Furthermore, the plateau was reached at 50.7:49.3/SAA with a 1335 g BWG for 21% CP, and for the level of 19.5% CP it was reached at 53.2:46.8/SAA, obtaining 1315 g BWG. On the other hand, the FCR was decreased in order to Met/SAA increasing for both CP levels. Similar to BWG, the rate of decrease (around 0.001) was identical for both CP levels. Meanwhile, for the reduced CP, the plateau of FCR was reached with a value of 1.55, corresponding to 51.1 :48.9/SAA, whereas for the higher CP, the plateau was of 1.51 reached at 53.1:46.9/SAA rate.

#### *Nitrogen balance*

The results of the nitrogen balance trial are shown in table 3. It was observed that CP level affected  $N_{in}$ ,  $N_{out}$ , and  $k_N$ , where a reduction in the CP resulted in lower  $N_{in}$  ( $P < 0.05$ ) and consequently on the  $N_{out}$  ( $P < 0.05$ ), nonetheless resulted in an improvement in the  $k_N$  ( $P < 0.05$ ). Moreover, the CP level did not affect the NR ( $P > 0.05$ ). On the other hand, the NR and  $k_N$  were significantly affected by the ratio, where a lower ratio 42:58/SAA evidenced a lower NR, with no showing difference between 50:50/SAA and 58:42/SAA

( $P < 0.05$ ). A different result was shown for  $K_N$ , where the highest ratio 58:42/SAA presented a better efficiency. No interaction between CP and Met:Cys/SAA was demonstrated for NR and nitrogen utilization efficiency.

## DISCUSSION

The dose-response approach is used to determine the SAA requirement, mainly by supplementing DL-methionine. This procedure has a practical implication since this amino acid is commercially available. However, the digestible fraction of methionine is converted into cystine through transsulfuration pathway (Oliveira Neto, 2014). Therefore, the SAA requirement determination could be affected depending on the digestible methionine and cystine ratio. According to NRC (1994), the digestible SAA requirement for growing chickens between 3 to 6-old-wks is around 0.72%, Rostagno et al. (2017) recommend 0.94%, and Cobb Vantress (2018) recommended 0.83% of SID Met+Cys. The trial was conducted by reducing the digestible SAA in all treatments to guarantee the limitation of this nutrient. However, it did not affect the performance during the experimental period compared to the Cobb 500 manual (2018). Millecam et al. (2021) conducted a study with a lower level of SAA (0.66% SAA), obtaining a more significant gain in body weight and a lower feed conversion in growing chickens.

We found that CP reduction did not affect the BWG but decreased the FI and FCR. Also, the CP reduction affected FCR just when birds were fed with a significant reduction on Met/SAA, but the performance for 54:46/SAA was similar to the normal CP level. Baker et al. (1996) published a work exploring the SAA ratios. They evaluated diets based on corn and peanut meal without crystalline amino acid supplementation, obtaining a better response for BWG and FCR with 56 Met/SAA, and negatively affecting with a lower 41.5 Met/SAA. This report calls attention to the changes in the Met:Cys/SAA ratio using ingredients with high cystine. Although L-cystine is not commercially available, manipulation can be done using ingredients with a high cystine content, such as a peanut meal containing around 0.47% SID cystine, which we included in our study to turn feasible the Met/Cys manipulation. Other ingredients with higher cystine levels can be used as wheat gluten (1.52% SID Cys), feather meal (1.78-2.17% SID

Cys), canola (0.72% SID Cys ), cotton seed (0.54 SID Cys, and some algae (spirulina platensis 1.02% SID Cys).

Other recent studies obtained the same results as our study, where Agostini et al. (2016), evaluated the Met/SAA by increasing supplementation of DL-methionine (47, 52, 57, 61, and 66 Met/SAA) in diets for growing chickens (10-28-old-days). These authors observed an increasing quadratic response in BWG and FI with increased Met/SAA and improved FCR, obtaining a better performance with 52 Met/SAA. Additionally, Pacheco et al. (2018), evaluated different SAA ratios in the same ages as our study, in which DL-methionine and L-cystine were supplemented, obtaining five different proportions from 44 to 56 Met/SAA, showing that a lower Met/SAA ratio affected BWG and FCR and the better responses were for 52 Met/SAA. Based on these results, it should be inferred that independent of the digestible SAA sources (from the ingredient or crystalline) and for two different levels of PB growing birds, the Met/SAA variation expresses the same behavior on the performance, showing improvements when methionine is increased in the SAA.

Another aspect interesting to observe is the birds, especially during the feather growth stage, which could influence the adequacy of Met:Cys/SAA. Lopez-Coelho (2013) mentioned that during the transition from plumage to feathers, there is a possibility that cystine requirement increases, which could affect the optimum Met:Cys/SAA ratio compared to other older feathered birds. That is because the protein in feathers has a large SAA content, around twice that of body protein (Nir, 1994).

Among the amino acids that make up the feathers, the sulfur amino acids, methionine and cystine, are the most required for broilers during feather growth (Macari et al., 2017). According to Leeson and Summers, (2008) 25% of cystine and 2% of dietary methionine are used exclusively for the synthesis of keratin. Furthermore, it is worth noting that cystine participates directly in this process while methionine acts in the conversion to cystine (Moran et al., 1966). Ferket et. al., (1997) observed that the amino acid profile of feathers changes during bird growth. Even with the implications of a possible increase in cystine requirements in the growth and renovation of feathers, this is not significantly observed in the changes of the SAA ratio. A possible explanation would be that L-cystine is

rapidly absorbed in the intestine, and its sulfhydryl group can easily bind to plasma proteins, preventing its metabolic use as a cystine molecule itself.

Conde et al., (2013) Used the Ross broiler strain to evaluate a diet 22% deficient in sulfur amino acids and another diet containing 13% excess compared to the strain manual and observed that the amino acid deficient diets had greater methionine retention. In relation to excessive diet (71 and 51%) respectively, containing greater retention in the carcass. When cystine retention was calculated for both diets, no marked difference was observed in retention, with 80% diets with deficiency and 82% diets with excess sulfur amino acids, being retained in greater proportion in feathers. Corroborated by Pacheco et al. (2018), observed a higher cystine retention than methionine in feathers. Meanwhile, the metabolic participation of methionine is major as an initiator of protein synthesis, donor of the methyl group and precursor of other metabolites or cystine itself. can be justified, with the Relationship between the synthesis of Ser and the metabolism of Met in conditions of low availability in methyl groups, in particular with a negative correlation between the synthesis of Ser and the remethylation of homocysteine to form Met, being able to have the increase of Ser synthesis may reflect an adaptation of methyl metabolism (Cuskelly et al., 2001; Pillai et al., 2006, Conde Aguilera et al., 2010).

According to Gordon and Sizer (1995), excess methionine supplementation in diets with lower cystine content does not completely satisfy the SAA requirement of the fast-growth strain of broiler chickens. Meanwhile, Conde et al. (2013), demonstrated that methionine deficiency results in lower FI. Pacheco et al. (2018), evidenced that the methionine to cystine conversion occurs as a metabolic priority independent of L-cystine supplementation.

One of the first to study this topic, Graber et al. (1971), mentioned that although methionine and cystine correspond to SAA, they should be treated separately. Meanwhile, the metabolic relationship between both makes it impossible to determine the requirements for each one, and if together, consider the fractions based on SAA (Pacheco et al., 2018).

Increasing the methionine fraction of SAA improves BWG up to 54 of the Met/SAA level. When the ratio values are close to those recommended by (Baker

et al., 1996, Rostagno et al., 2017 and Pacheco et al., 2018) no difference was observed in FCR regardless of the level of protein used. The same happens with FI, when the lowest ratio (42:58) was observed, differences ( $P < 0.05$ ) were observed, with a decrease in consumption occurring when birds were fed with a high PB content. Resulting more efficient when methionine is above 50 in the ratio for better efficiency.

It was indicated by the lower nitrogen utilization when birds are fed with 21.5% of CP is related to the digestible protein profile and an excess of nitrogen above the bird's requirement that should be excreted. These results support the theory that it is essential to maintain the SAA equilibrium to improve the metabolic and physiological utilization in growing chickens in diets with CP reduction, which could enhance nitrogen utilization and reduce their excretion.

These results could be explained by the nitrogen utilization, where CP reduction decreases nitrogen excretion but improves the utilization efficiency, resulting in the same BWG. Result demonstrated by Belloir et al., (2017) corroborates with our results, where the nitrogen retention efficiency increased from +3.2% to +3.6%/percentage point of CP when the CP content of the diet was reduced. Nitrogen excretion per kg BW gain decreased with decreasing CP content, from 2.1 to 2.9 g/kg BW gain/CP percentage point. The authors evaluated the composition of the excreta and demonstrated a decrease in nitrogen and the moisture content decreased slightly when the CP content of the diet was reduced. Other authors highlighted that higher dietary CP increase nitrogen excretion requiring more energy for nitrogen metabolism and principally for the metabolization and transport of excreted nitrogen wasted, worsening on the birds' performance (Cauwenberghe & Burnham 2001; Vasconcellos et al., 2011).

We found that the Met:Cys/SAA ratio influenced the nitrogen balance parameters of NR and KN where a lower SAA ratio impairs retention. Meanwhile, a higher proportion improves efficiency, It can be explained by Belloir et al., (2017) that an adequate AA profile in the diets does not affect the performance parameters of the birds. Another explanation that better utilization efficiency is linked with low protein diets is that, with reduced need for N excretion due to better N utilization, considerably less Gly would be required for uric acid

formation. In addition, the broilers used in our study may have been more efficient, due to genetic selection for feed efficiency over a decade (Siegert et al., 2015; Lemme et al., 2017).

The values analyzed in our study for nitrogen use efficiency are high when compared to other studies in the literature. However, the work by Ullrich et al (2018) reported that for the birds not to have their performance compressed with the reduction of crude protein that the optimal efficiency of N is 70%. Hilliar et al (2017) reported that it is possible to reach a N utilization of 72%, being possible to increase this N utilization when the dietary protein is even lower. According to Lemme et al., (2019) these results demonstrate that not only is the genetic potential of modern broilers to deposit nitrogen very high, but also that it can also be used on a large scale under well-controlled conditions.

Pacheco et al. (2018) using lable isotopes for both sulfur amino acids, found that when methionine is a smaller fraction of SAA, affects the protein synthesis and, consequently, the lean tissue deposition since the methionine prioritized the biosynthesis of cystine and their precursors. This was demonstrated by the higher recovery of methionine in the carcass for diets with Met/SAA above 50. In the same way, the cystine recuperation increased only up to 50 Met/SAA. In contrast, before this ratio, it was no longer stored on the feathers, explaining why utilization efficiency is superior for 58 Met/SAA.

No interaction of CP and Met/SAA was found for the nitrogen balance, even though it was evidenced in the performance response. Based on these results, a CP reduction does not affect the performance or reduce the nitrogen excretion, taking into consideration the Met:Cys/SAA, with a major fraction of methionine.

## **CONCLUSION**

A CP reduction could be a recommendable tool to reduce the nitrogen excretion without a negative effect on the performance since Met:Cys/SAA is considered; 51:49/SAA improved the FCR when CP was reduced to 19,5%.

## REFERENCES

- Aftab U, Ashraf M, Jiang Z et al., (2006) Low protein diets for broilers. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p.688-701.
- Agostini PS, Dalibard P, Mercier Y, Van der Aar P and Van der Klis JD, (2026) Comparison of methionine sources around requirement levels using a methionine efficacy method in 0 to 28 day old broilers. **Poultry Science** 95:560–569.
- Ahmed EM, Abbas TE, (2011) Effects of dietary levels of methionine on broiler performance and carcass characteristics. **Int J Poult Sci**. 10(2):147–151.
- Aletor VA, Hamid II, Nieb E, et al, (2000) Low-protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: effects on performance, carcass characteristics, whole-body composition and efficiencies of nutrient utilisation. **J. Sci. Food Agric.**, v.80, p.547-554.
- AOAC Association of Official Analytical Chemists (1997). In Official methods of analysis, 16th edition/3rd revision edition (ed. P Cunniff). AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
- Baker DH, (2009) Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. **Rev. Amino Acids**, v. 37, n.1, p. 29-41.
- Baker DH, Fernandez SR, Webel DM and Parsons CM, (1996) Sulfur amino acid requirement and cystine replacement value of broiler chicks during the period three to six weeks post-hatching. **Poultry Science**, 75: 737-42.
- Blair R, Jacob JP, Ibrahim S, et al, (1999) A quantitative assessment of reduced protein diets and supplements to improve nitrogen utilization. **J. Appl. Poult. Res.**, v.8, p.25-47.
- Cauwenberghe SV, Burnham D, (2001) New developments in amino acid and protein nutrition of poultry, as related to optimal performance and reduced nitrogen excretion. In: EUROPEAN SYMPOSIUM OF POULTRY NUTRITION, 3., Blankenberge, Belgium. Proceedings... Blankenberge, Belgium.
- Cerrate S, Corzo A (2019) Lysine and Energy Trends in Feeding Modern Commercial Broilers. **International Journal of Poultry Science** 18: 28-38.
- Cobb-Vantress I. Cobb® 500 breeder management guide. 2018.
- Conde-Aguilera JA, Barea R, Le Floc'h N, Lefaucheur L, and Van Milgen J (2010) A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. **Animal** 4:1349–1358.
- Conde-Aguilera JA, Cobo-Ortega C, Tesseraud S, Lessire M, Mercier Y, and Milgen JV, (2013) Changes in body composition in broilers by a sulfur amino acid deficiency during growth. **Poultry Science** 92:1266–1275.



Corzo A et al. (2004) Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crude protein diets. **Animal Feed Science and Technology**, v.118, p.319–327.

Corzo A, Fritts CA, Kidd MT, et al, (2005) Response of broiler chicks to essential and non-essential amino acid supplementation of low crude protein diets. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.118, p.319-327.

Costa FGP, Rostagno HS, Albino LFT, Gomes PC, Toledo RS, Vargas Junior JG, (2001) Níveis dietéticos de proteína bruta para frangos de corte de 1 a 21 e 22 a 42 dias de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1498-1505.

Cuskelly GJ, Stacpoole PW, Williamson J, Baumgartner TG and Gregory JF (2001) Deficiencies of folate and vitamin B6 exert distinct effects on homocysteine, serine, and methionine kinetics. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281:E1182–E1190.

De La Llata M, Dritz SS, Tokach MD et al. (2002) Effects of increasing L-lysine HCl in corn- or sorghum-soybean mealbased diets on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. **Journal of Animal Science**, v.80, n.9, p.2420-2432.

Dersjant LY, Peisker M. (2011), A review on recent findings on amino acids requirements in poultry studies. **Iran J Appl Anim Sci.** 1:73–79.

Faria Filho DE, Rosa OS, Vieira BS et al, (2005) Protein levels and environmental temperature effects on carcass characteristics, performance, and nitrogen excretion of broiler chickens from 7 to 21 days of age. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v.7, p. 247-253.

Faridi A, Gitoee A, Sakomura NK, Donato DCZ, Angelica GC, Feire Sarcinelli M, Bernardino de Lima M e France J, (2016) Broiler responses to digestible total sulphur amino acids at different ages: a neural network approach, **Journal of Applied Animal Research**, 44:1, 315-322.

Ferket PR, Chen F., and Thomas LN (1997) Effect of age on carcass and feather amino acid profile in turkeys. **Poultry Science**, 76(Suppl.1):82.

Gordon RS and Sizer IW, (1955) Ability of sodium sulfate to stimulate growth of the chicken. **Poultry Science** 122: 1270-1271.

Goulart CC, Costa FGP, Silva JHV, Souza JG, Rodrigues VP, Oliveira CFS, (2011) Requirements of digestible methionine + cystine for broiler chickens at 1 to 42 days of age. **Revista Brasileira de Zootecnia.** 40(4):797–803.

Graber G, Baker DH, (1971) Sulfur amino acid nutrition of the growing chick: quantitative aspects concerning the efficacy of dietary methionine, cysteine and cystine. **Journal of animal science**, v. 33, n. 5, p. 1005-1011.

growth and composition". **World's Poultry Science Journal** 60: 42 – 51.

Hilliar, M. Morgan N, Hargreave G, Barekatin R, Wu S, and Swick R. (2017). Effects of glycine supplementation in low protein diets on water consumption and performance in broilers. In Proc. 21st European Symposium on Poultry Nutrition, Salou, Spain.

Kalinowski AET, Moran Jr, and Wyatt C, (2003) Methionine and cystine requirements of slow- and fast-feathering male broilers from zero to three weeks of age. **Poultry Science**. 82:1423–1427.

Kerr BJ, Kidd MT,(1999) Amino acid supplementation of low-protein broiler diets: 1. Glutamic acid and indispensable amino acid supplementation. **Journal of Applied Poultry Research**, v.8, p.298-309.

Klasing KC, Barnes DM (1988) Decreased amino acid requirements of growing chicks due to immunologic stress. **J Nutr** 118:1158– 1164.

Leeson S and Walsh T (2004) Feathering in commercial poultry. I. Feather

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM, Princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 975p., 2011.

Lemme A. (2017) Dietary protein reduction and implications on animal nutrition. In Proc. 30th Annual Convention of Philippine Society of Animal Nutritionists. Manila, Philippines.

Lemme A, Hiller P, Klahsen M, Taube V, Stegemann J, Simon I. (2019). Reduction of dietary protein in broiler diets not only reduces N-emissions but is also accompanied by several further benefits. **J. Appl. Poult. Res** 0, 1–14.

Lopez-Coello C. Potential causes of broiler feathering problems. St. Louis, MO: Feathering Manual. Novus International; 2003. p. 1–46.

Macari M, Furlan RL, Gonzales E, (2017) Fisiologia Aviária Aplicada a Frangos de Corte. Jaboticabal: Funep.

Millecam J, Khan DR, Dedeurwaerder A, Saremi B, (2021) Optimal methionine plus cystine requirements in diets supplemented with L-methionine in starter, grower, and finisher broilers. **Poultry Science** 100(2):910-917.

Moran ET, Summers JD and Slinger SJ (1966) Keratin as a source of protein for the growing chick. **Poultry Science**. 45: 1257-1266.

Muramatsu T, Okumura J (1979) Nitrogen sparing action of dietary methionine and arginine in chicks fed a protein-free diet. **Nutr Rep Int** 19:335–342.

Namroud NF, Shivazad M, Zaghari M, (2008) Effects of fortifying low crude protein diet with crystalline amino acids on performance, blood ammonia level, and excreta characteristics of broiler chicks. **Poultry Science**, v.87, p.2250-2258.

National Research Council. (1994) Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC.

Nir I. (1994) Relationship between feathering and performance in broilers and layers. Pages 65–66 in 9th European Poultry conference, Glasgow.UK.

Pacheco LG, Sakomura NK, Suzuki RM, Dorigam JC, Viana GS, Van Milgen J, & Denadai JC (2018). Methionine to cystine ratio in the total sulfur amino acid requirements and sulfur amino acid metabolism using labelled amino acid approach for broilers. **BMC Veterinary Research**, 14(1), 364.

Pillai PB, Fanatico AC, Beers KW, Blair ME and Emmert JL (2006). Homocysteine remethylation in young broilers fed varying levels of methionine, choline, and betaine. **Poult. Sci.** 85:90–95.

Rocha PT, Stringhini JH, Andrade MA, et al (2003) Desempenho de frangos de corte alimentados com rações pré-iniciais contendo diferentes níveis de proteína bruta e energia metabolizável. **Rev. Bras. Zootec.**, v.32, p.162-170.

Rostagno HS, Albino LFT, Hannas MI, Donzele JL, Sakomura NK, Perazzo FG, Saraiva A, Abreu MLT de, Rodrigues PB, Oliveira RF de, Barreto SLT, Brito CO (2017) Tabelas brasileiras para aves e suínos – Composição de alimentos e exigências nutricionais, 4 ed., Viçosa.

Siegert W, Ahmadi H, and Rodehutsord M (2015). Meta-analysis of the influence of dietary glycine and serine, with consideration of methionine and cysteine, on growth and feed conversion of broilers. **Poult. Sci.** 94:1853–1863.

Suida D, (2001) Formulação por Proteína Ideal e Consequências Técnicas, Econômicas e Ambientais. In: I Simpósio Internacional de Nutrição Animal: Proteína ideal, energia líquida e modelagem – Santa Maria, RS – Brasil, p. 1-17.

Ullrich C, Langeheine M, Brehm R, Taube V, DSiebert, and Visscher C (2018). Influence of reduced protein content in complete diets with a consistent arginine–lysine ratio on performance and nitrogen excretion in broilers. *Sustainability* 10:3827 (1-14).

Vieira SL, Stefanello C, Sorbara JO, (2014) Formulating poultry diets based on their indigestible components. **Poultry Science**, v. 93, p. 2411-2416.

Waldroup PW, Jiang Q, Fritts CA, (2005) Effects of glycine and threonine supplementation on performance of broiler chicks fed diets low in crude protein. **International Journal Poultry Science**, v.4, p.250-257.

Webel DM, Baker DH (1999) Cystine is the first-limiting amino acid for the utilization of endogenous amino acids in chicks fed a protein-free diet. **Nutr Res** 19:569–577.

Table 1. Ingredients and nutritional composition of the experimental diets

Ingredients, g/kg	Dietary crude protein (%CP) / Met:Cys/SAA									
	21.5 42:58	21.5 46:54	21.5 50:50	21.5 54:46	21.5 58:42	19.5 42:58	19.5 46:54	19.5 50:50	19.5 54:46	19.5 58:42
Corn (7.86%)	530.00	531.00	529.00	529.00	529.00	630.00	627.00	629.00	628.00	627.00
Soybean meal (45%)	218.00	221.00	217.00	217.00	217.00	279.00	260.00	267.00	266.00	261.00
Peanuts meal (40.75%)	157.00	153.00	158.00	158.00	158.00	153.00	38.00	30.00	32.00	37.00
Oil	54.00	54.00	54.00	54.00	54.00	32.00	33.00	32.00	32.00	33.00
Dicalcium Phosphate	18.00	19.00	18.00	18.00	18.00	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
Limestone	7.90	7.90	7.90	7.90	7.90	7.80	7.80	7.80	7.80	7.80
Salt	1.90	2.00	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90	1.90
Sodium bicarbonate	2.40	2.40	2.40	2.40	2.40	2.60	2.60	2.60	2.60	2.60
Vitamin and Mineral premix <sup>1</sup>	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60	1.60
DL-Methionine (98%)		0.20	0.50	0.70	0.90		0.20	0.50	0.70	0.90
L- Lysine (99%)	3.80	3.70	3.80	3.80	3.80	3.60	3.80	3.70	3.70	3.80
L-Threonine (98%)	1.30	1.30	1.30	1.30	1.30	1.40	1.50	1.40	1.40	1.50
L-Valine (99%)	0.60	0.60	0.60	0.60	0.60	1.10	1.20	1.10	1.10	1.20
L- Cystine (100%)	0.90	0.70	0.50	0.20		0.90	0.70	0.50	0.20	
L- Isoleucine (100%)						0.20	0.30	0.30	0.30	0.30
Choline chloride (60%)	1.60	1.50	1.60	1.60	1.60	1.10	1.20	1.10	1.10	1.20
Mycotoxin adsorbent	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Nutritional composition (calculated and analyzed)										
Metabolizable energy (Mcal/kg)	3.08	3.08	3.08	3.08	3.08	3.08	3.08	3.08	3.08	3.08
Crude protein (%)	21.5	21.5	21.5	21.5	21.5	19.5	19.5	19.5	19.5	19.5
SID Met+Cys x (%)	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
SID Methionine (%)	0.26	0.29	0.31	0.33	0.36	0.26	0.29	0.31	0.33	0.36
SID Cystine (%)	0.36	0.33	0.31	0.29	0.26	0.36	0.33	0.31	0.29	0.26
SID Lysine (%)	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12	1.12
SID Threonine (%)	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73	0.73
SID Valine (%)	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
SID Isoleucine (%)	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78	0.78
Crude protein (%) – Analyzed	(22.3)	(22.8)	(22)	(22.2)	(22.3)	(19.7)	(19.5)	(19.9)	(19.7)	(20)
SID Met+Cys (%) – Analyzed	(0.62)	(0.62)	(0.62)	(0.61)	(0.60)	(0.60)	(0.59)	(0.60)	(0.60)	(0.59)
SID Methionine (%) – Analyzed	(0.25)	(0.27)	(0.29)	(0.31)	(0.33)	(0.24)	(0.26)	(0.29)	(0.31)	(0.32)
SID Cystine (%) – Analyzed	(0.37)	(0.34)	(0.32)	(0.29)	(0.27)	(0.36)	(0.33)	(0.31)	(0.29)	(0.27)
SID Met:Cys calculated from analyzed values	(40:60)	(44:56)	(47:53)	(51:49)	(54:46)	(40:60)	(44:56)	(48:52)	(51:49)	(55:45)

---

1 Content (per kg of diet) – vit. A = 10,575 UI; vit. D3 = 2554 UI; vit. K = 1.8 mg; vit. E = 14.87 mg; vit. B1 = 2.00 mg; vit. B2 = 4.5 mg; vit. B6 = 2.50 mg; vit. B12 = 2.00 mg; niacin = 30.00 mg; folic acid = 0.75 mg; calcium pantothenate = 11.74 mg; biotin = 0.01; iron = 43.44 mg; zinc = 43.35 mg; copper = 8.56 mg; manganese = 56.00 mg; iodine = 0,56 mg; selenium = 0,34 mg; antioxidant 4.20 mg; Salinomycin sodium 12%; Butil hidroxy toluene BHT; adsorbente 0.001%. Values in parentheses indicate analyzed dietary concentration of the amino acids (AMINODat 6.0).

---

Table 2. Effect of performance response of body weight gain (BWG), feed intake (FI), and feed conversion rate (FCR) in broiler chickens fed with different protein levels and Met:Cys/SAA ratio from 14 to 28-day-old.

Protein	Met:Cys/SAA	BWG (g/b.d)	FCR (g:g)	FI (g/b.d)
21.50	42:58	1075	1.67 <sup>B</sup>	1796 <sup>C</sup>
	46:54	1241	1.58 <sup>CD</sup>	1964 <sup>BC</sup>
	50:50	1297	1.55 <sup>DE</sup>	2005 <sup>AB</sup>
	54:46	1338	1.53 <sup>EF</sup>	2043 <sup>AB</sup>
	58:42	1357	1.49 <sup>F</sup>	2011 <sup>AB</sup>
19.50	42:58	1108	1.73 <sup>A</sup>	1912 <sup>D</sup>
	46:54	1230	1.61 <sup>C</sup>	1976 <sup>ABC</sup>
	50:50	1259	1.58 <sup>CD</sup>	1989 <sup>ABC</sup>
	54:46	1327	1.53 <sup>EF</sup>	2031 <sup>AB</sup>
	58:42	1301	1.57 <sup>CDE</sup>	2050 <sup>A</sup>
SEM		0.013	0.009	0.011
Main factors effect				
Protein	21.50	1262	1.56 <sup>b</sup>	1964 <sup>b</sup>
	19.50	1247	1.60 <sup>a</sup>	1992 <sup>a</sup>
Met:Cys/SAA	42:58	1092 <sup>D</sup>	1.70 <sup>A</sup>	1854 <sup>C</sup>
	46:54	1236 <sup>C</sup>	1.59 <sup>B</sup>	1970 <sup>B</sup>
	50:50	1278 <sup>B</sup>	1.56 <sup>C</sup>	1997 <sup>AB</sup>
	54:46	1333 <sup>A</sup>	1.53 <sup>D</sup>	2037 <sup>A</sup>
	58:42	1333 <sup>A</sup>	1.53 <sup>D</sup>	2031 <sup>A</sup>
Probability				
Protein		0.122	<0.001	0.018
Met:Cys/SAA		<0.001	<0.001	<0.001
Interaction		0.08	0.014	0.004

a, b, c, d, A, B, C, D Different letters on the same column represent statistical difference for Tukey test with 95% confidence interval. SEM: standard error of the mean.

Table 4. Nitrogen balance parameters of nitrogen intake (N<sub>in</sub>), excretion (N<sub>out</sub>), retention (NR) and efficiency of nitrogen utilization (k<sub>N</sub>) of broiler chickens from 14 to 28-day-old subject to two levels of protein and Met:Cys/SAA ratio.

Protein	Met:Cys/SAA	N <sub>in</sub>	N <sub>out</sub>	NR	k <sub>N</sub>
21.50	42:58	5.61	1.9	3.71	0.661
	50:50	5.92	1.89	4.03	0.680
	58:41	6.12	1.75	4.37	0.714
19.50	42:58	5.07	1.58	3.49	0.690
	50:50	5.59	1.62	3.99	0.712
	58:42	5.61	1.48	4.13	0.737
SEM		0.104	0.046	0.078	0.005
Main factors effect					
Protein	21.50	5.89 <sup>a</sup>	1.84 <sup>a</sup>	4.04	0.685 <sup>b</sup>
	19.50	5.42 <sup>b</sup>	1.56 <sup>b</sup>	3.87	0.713 <sup>a</sup>
Met:Cys/SAA	42:58	5.34	1.74	3.60 <sup>B</sup>	0.676 <sup>B</sup>
	50:50	5.76	1.76	4.01 <sup>A</sup>	0.696 <sup>B</sup>
	58:42	5.87	1.62	4.25 <sup>A</sup>	0.725 <sup>A</sup>
Probability					
Protein		0.021	0.001	0.215	<0.001
Met:Cys/SAA		0.075	0.321	0.001	<0.001
Interaction		0.884	0.961	0.796	0.852

a,b, A, B Different letters on the same column represent statistical difference for Tukey test with 95% confidence interval. SEM: standard error of the mean.

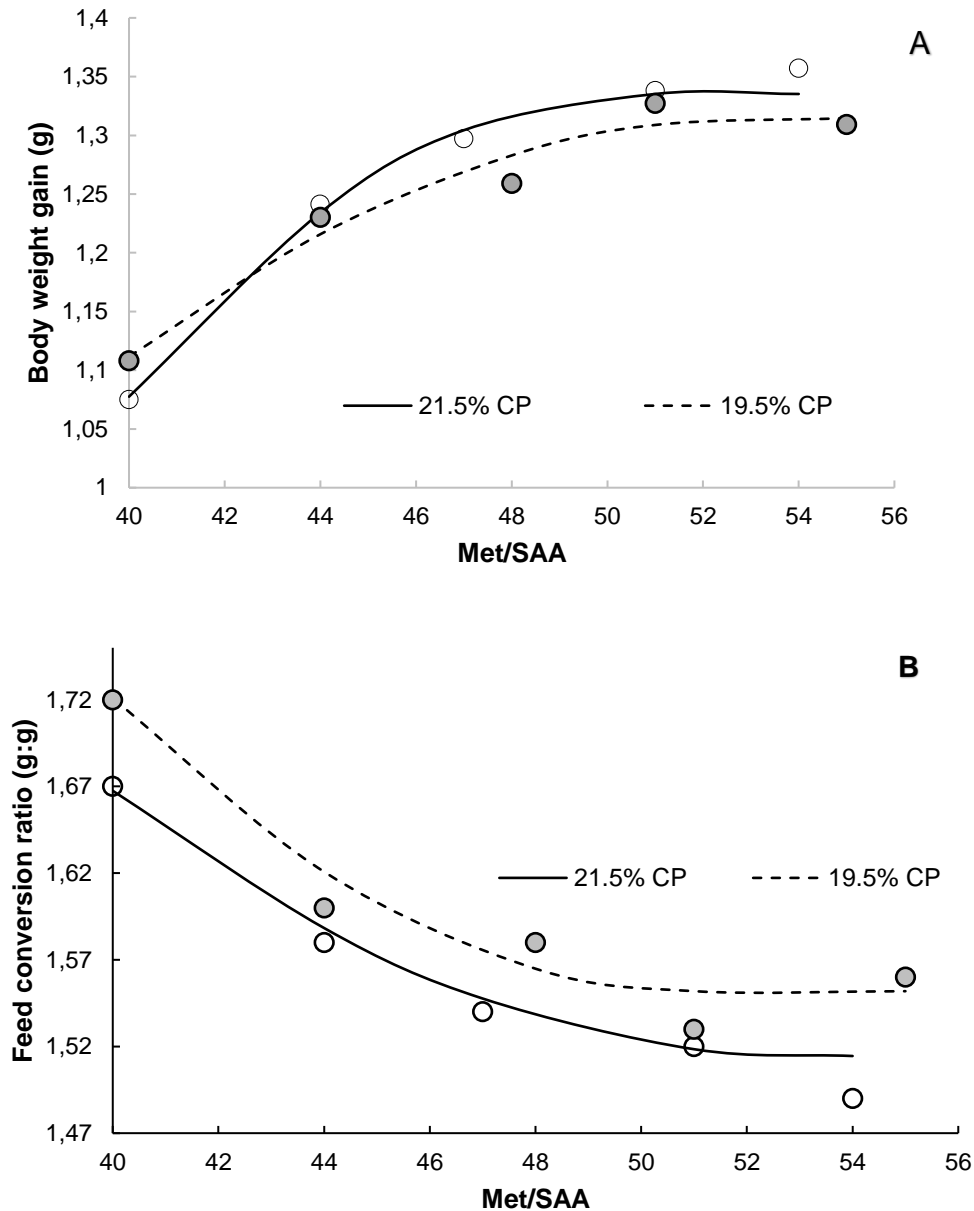


Figure 1. Quadratic broken line model fit to **A.** body weight gain (BWG) and **B.** feed conversion ratio (FCR) in the function of Met/SAA ratio for 21.5% of protein (continuous line) and 19.5% (dash line). The fit of each non-linear regression was significant ( $P < 0.05$ ). SE is the standard error for each estimated parameter,  $R^2_{adj}$  is the adjusted R-square and RSEM is the root mean square error.

$$\text{(Eq. 21.5\% CP BWG)} Y = 1,34 \pm 0,01 - 0,002 \pm 0,0006 * (51 \pm 1,38 - \text{Met/SAA})^2; R^2_{adj} = 0,85; \text{RSEM} = 0,045$$

$$\text{(Eq. 19.5\% CP BWG)} Y = 1,31 \pm 0,01 - 0,001 \pm 0,001 * (53 \pm 2,43 - \text{Met/SAA})^2; R^2_{adj} = 0,78; \text{RSEM} = 0,043$$

$$\text{(Eq. 21.5\% CP FCR)} Y = 1,51 \pm 0,01 + 0,0009 \pm 0,0003 * (53 \pm 2,24 - \text{Met/SAA})^2; R^2_{adj} = 0,79; \text{RSEM} = 0,023$$

$$\text{(Eq. 19.5\% CP FCR)} Y = 1,55 \pm 0,008 + 0,001 \pm 0,0004 * (51 \pm 1,63 - \text{Met/SAA})^2; R^2_{adj} = 0,83; \text{RSEM} = 0,022$$