



NILSON NUNES MORAIS JÚNIOR

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS
COM ANÁLOGO DE METIONINA E PROTEÍNA
DE SOJA**

LAVRAS-MG

2013

NILSON NUNES MORAIS JÚNIOR

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS COM ANÁLOGO DE
METIONINA E PROTEÍNA DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Marcos Neves Pereira

Coorientadores

Dr a. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

Dr. Euler Rabelo

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Morais Júnior, Nilson Nunes.

Suplementação de vacas leiteiras com análogo de metionina e
proteína de soja / Nilson Nunes Moraes Júnior. – Lavras : UFLA,
2013.

132 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Vacas leiteiras - Aminoácidos. 2. Vacas leiteiras - Nutrição
protéica. 3. Ácido 2-hidróxi-4-metiltio-butírico. 4. Proteína do leite.
5. Vacas leiteiras - Plasma - Nitrogênio uréico. 6. Vacas leiteiras -
Síntese microbiana ruminal. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 636.208557

NILSON NUNES MORAIS JÚNIOR

**SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS COM ANÁLOGO DE
METIONINA E PROTEÍNA DE SOJA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 30 de agosto de 2013.

Dr. Ronaldo Braga Reis	Escola de Veterinária/UFMG
Dr. Fernando César Ferraz Lopes	EMBRAPA/CNPGL
Dr. Gustavo Augusto de Andrade	IFSULDEMINAS/ Campus Machado
Dr. Sandro César Salvador	UFLA

Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

LAVRAS-MG

2013

*A minha esposa **Cecília Sandra Nunes Morais;***

aos meus filhos

Nilson Nunes Morais Neto,

Natalia Alesandra Nunes Morais

e Eduardo Lucas Nunes Morais.

aos meus pais

Nilson Nunes Morais e Maria José Mesquita Morais,

e aos meus irmãos

Gizelly, Jonas e Jefferson.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por iluminar meus caminhos, colocando sempre em minha vida, anjos providos da capacidade de me guiar e ajudar, e que me permitiu vencer mais esta etapa.

Ao meu orientador, Professor Marcos Neves Pereira pela imensa dedicação a minha formação, e principalmente pela visão de ciência que tive a oportunidade de vivenciar e aprender durante todo o nosso intenso convívio ao longo deste curso e a minha Coorientadora Dr (a). Renata Apocalypse Nogueira Pereira por todo aprendizado e convivência, principalmente pelo envolvimento me apoiando nos momentos difíceis e a ambos por terem depositado em mim confiança, apoio e incentivo, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora Dr. Ronaldo Braga Reis, Dr. Fernando César Ferraz Lopes, Dr. Gustavo Augusto de Andrade e Dr. Sandro César Salvador, pelas valiosas e imprescindíveis contribuições ao trabalho.

Aos professores Márcio Machado Ladeira, Mario Luiz Chizzotti, Marcos Neves Pereira, Iraídes Ferreira Furucho Garcia e Thiago Fernandes Bernardes pela contribuição direta em minha formação acadêmica durante o Doutorado e a todos os professores do DZO que se empenham no propósito de ensinar e fazer ciência animal.

Aos laboratoristas do DZO e do DCA, em especial ao Márcio e Tina, por colaborar na parte laboratorial e análises. E a todos os funcionários do DZO, em especial ao Carlos atuando na Secretaria de Pós-Graduação pelo apoio durante todas as etapas.

As Fazendas São Francisco e Agrindus pela oportunidade de realizar as etapas experimentais utilizando animais de seus plantéis e todos os seus

funcionários pelo empenho e dedicação na realização laborosa desta etapa experimental.

Aos colegas e amigos de Pós-Graduação e participantes do Grupo do Leite Gilson Sebastião Dias Júnior, Gustavo Salvati, Naina Lopes, Vitor Silveira, Rafael Caputo, Ronaldo Francisco de Lima, Ozana Zacaroni, Willian Pereira dos Santos, Amanda Guimarães, Rayana Brito da Silva e Zinaldo Firmino da Silva agradeço imensamente a todos pela imprescindível participação durante a execução dos experimentos e análises laboratoriais; e pelo apoio, companheirismo, amizade e intenso convívio.

A todos os integrantes do Grupo do Leite da UFLA, em especial Gil Pessoa Junior, Alexandre Valise, Thiago Fontes, Lucas Barbosa, Ana Cássia Melo, Bruno Gonzales, Bruno Junqueira, Bruno Monteiro, Fabiana Cardoso, Fernando Scarpa, Jeferson Freitas, João Paulo, Lauro Maranhã, Lucas de Castro, Lucas Carneiro, Roberto Vilela, Ricardo Araújo, Paulo Barros, Raquel Medeiros, Karina Freire, Iury Rios (*in memoriam*) e a todos os integrantes que de forma direta ou indiretamente participaram deste trabalho, ficam meus agradecimentos pela imensurável colaboração.

Ao Instituto Federal do Espírito Santo *Campus* Itapina, na pessoa de seus dirigentes por me proporcionar a oportunidade de realizar o curso de doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, apoiando financeiramente a realização desta pós-graduação.

A Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por me proporcionarem realizar mais esta etapa de formação profissional em excelentes condições.

A empresa ADISSEO, na pessoa de Márcio Ceccantini, pelo apoio financeiro e em especial a viabilização das análises de aminoácidos no plasma.

A EMBRAPA CNPGL, na pessoa de Fernando César Ferraz Lopes pelo apoio a análises laboratoriais.

Aos meus pais Nilson e Maria José; meus irmãos, Jefferson, Gizelly e Jonas; minha avó Abigail Nunes Coelho (*in memorian*); meus tios Osmar, Vera, Evandro, Lourdes, Evandro Cana Brava e Edna Moraes . Aos integrantes da minha família, Daniele, Regina, Daniel, Reinaldo, Gizelle, Fernando, Carla, Maria da Luz, Vanderley, Maria, Erasmo, Adelina, Bonifácio, Joelma, José dos Reis, Adriana, Daniel Nunes, Aparecida (*in memorian*), em especial Carmelita Iria e todos os meus tios, sobrinhos, primos e a todos os meus familiares pelo carinho e apoio em todas as etapas da minha vida e ao longo deste Doutorado e que sempre incentivaram, torceram, vibraram e compartilharam comigo cada vitória.

Aos meus amigos do IFES Adriano Martins Pereira, Wilson Pancieri, João Marcos Louzada, Veredino Louzada, Marcelo Gomes Araújo, Marco Antônio de Carvalho, João Batista Pinotti e Nilton Nélio Cometti pela verdadeira amizade e apoio.

Em especial, a minha esposa Cecília Sandra, pela dedicação, paciência, e por todo o apoio dado ao longo do Doutorado e em todos os momentos da minha vida, e meus filhos Nilson Neto, Natalia e Eduardo, que mesmo na inocência de suas infâncias souberam compreender e cooperar nos momentos mais difíceis, meus mais sinceros e carinhosos agradecimentos.

Aos meus amigos da UFLA, do IFES e todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste árduo trabalho, fical meus sinceros e profundos agradecimentos.

RESUMO GERAL

Quatro experimentos avaliaram o desempenho de vacas leiteiras em dietas utilizando soja como principal fonte proteica. Os experimentos 1 e 2, em reversão simples, testaram substituição de soja crua por tostada Alfa Nutrisoja (Cooperalfa, Chapecó, SC) em dois níveis de inclusão. No experimento 1, foram utilizadas vinte e duas vacas e testada a substituição em 3,7% na matéria seca dietética. A soja tostada aumentou a produção de leite de 30,8 para 31,9 kg/dia, as secreções de sólidos totais e lactose. No experimento 2, com dezesseis animais foi testada a substituição em 11%. A dieta com soja tostada aumentou a produção de leite (+1,1 kg/dia) e lactose (+0,06 kg/dia), com redução na concentração de glicose plasmática (-3,4 mg/dL). Os experimentos 3 e 4 avaliaram a suplementação de HMBi (MetaSmart, Adisseo Inc., Antony, França), um análogo de metionina. No experimento 3, foram usadas vinte vacas, em delineamento quadrado latino, em arranjo fatorial 2x2, soja crua ou tostada e suplementadas ou não com HMBi. A substituição de soja crua por tostada aumentou a produção de leite de 34,6 para 37,8 kg/dia, e reduziu o nitrogênio ureico no leite e no plasma (NUP). A suplementação de HMBi não afetou o desempenho, mas reduziu NUP e a produção microbiana ruminal relativa. O Experimento 4, usando 234 vacas e realizado em condições controladas avaliou a suplementação de HMBi (MetaSmart, 35g/vaca/dia) em dieta com 17% de proteína bruta (PB). A suplementação com HMBi aumentou o rendimento e teor de proteína do leite, e a concentração de dez AA no plasma. A substituição de soja crua por soja tostada nos níveis testados aumentou a produção de leite sem afetar consumo e composição do leite. O análogo de metionina resultou em ganhos quando suplementado em dieta com excesso de PB.

Palavras-chave: Aminoácidos. Ácido 2-hidróxi-4-metiltio-butírico (**HMB**), Nitrogênio uréico no plasma. Proteína do leite. Síntese microbiana ruminal.

GENERAL ABSTRACT

Four experiments assessed the performance of dairy cows diets using soybean as the main protein source. Experiments 1 and 2 , in simple reversal (crossover), tested substitution of raw by heated soybean Alfa Nutrisoja (Cooperalfa , Chapecó , SC) at two levels of inclusion. In experiment 1 used twenty-two cows, tested replacement by 3.7 % in the dietary dry matter. The heated soybean increased milk production from 30.8 to 31.9 kg/day, the secretions of total solids and lactose. In experiment 2, used sixteen animals, was tested at 11% replacement. The heated soybean diet increased milk production (+1.1 kg/day) and lactose (+0.06 kg/day) and reduction in plasma glucose concentration (-3.4 mg/dL). Experiments 3 and 4 evaluate the supplementation HMBi (MetaSmart, Adisseo Inc., Antony , France), an analogue of methionine. In experiment 3, twenty cows were used in latin square desing, a 2x2 factorial arrangement, raw or heated soybean and with or without supplemented HMBi. The replacement of raw by toasted soybean increased milk yield from 34.6 to 37.8 kg/day, and reduction in milk and plasma (PUN) urea nitrogen. The supplementation HMBi did not affect performance, but reduced PUN and relative rumen microbial yield. Experiment 4, using two hundred thirty-four cows and carried in controlled conditions evaluated supplementation HMBi (MetaSmart, 35g/cow/day) in diets with 17% crude protein (CP). The supplementation HMBi increased yield and protein content of milk, and ten AA concentration in plasma. Replacement of raw by roasted soybean in the tested levels increased milk yield without affecting consumption and milk composition. The analogue of methionine resulted in gains when supplemented on a diet with excess CP.

Key words: Amino acids. 2-hydroxy 4-(methylthio)-butanoic acid (**HMB**). Plasma urea nitrogen. Milk protein. Rumen microbial synthesis.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Síntese de metionina por bactéria: vias de sulfidrilção e transulfuração.....23
- Figura 2 Bioconversão dos isômeros L e D do ácido 2-hidroxi-4-metiltio butírico (L-HMB e D-HMB) ou D-metionina (D-Met) em ácido 2-ceto-4- metiltio butírico (KMB) e este a L-metionina (L-Met).....25
- Figura 3 Reações químicas para obtenção do ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutírico (HMB) e o ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster (HMBi)28

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 2

- Figure 1. Plasma urea nitrogen (PUN) on treatments Raw Soybeans + Met (■), Raw Soybeans (◆), Heated Soybeans + Met (●), and Heated Soybeans (▲).....132

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1	Composição centesimal e química das dietas oferecidas e composição química das sobras e dietas consumidas (% da matéria seca). Experimento 168
Tabela 2	Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes nos tratamentos Soja Crua e Soja Tostada. Experimento 272
Tabela 3	Composição do leite e desempenho de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo soja crua ou soja tostada. Experimento 177
Tabela 4	Desempenho produtivo, sólidos do leite, relação alantóina:creatinina na urina e concentração de glicose no plasma de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo Soja crua e Soja tostada. Experimento 278
Tabela 5	Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo Soja crua e Soja tostada. Experimento 282
Tabela 6	Atividade mastigatória de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo Soja crua e Soja tostada. Experimento 282
Tabela 7	Cinética de degradação ruminal da proteína bruta na soja integral crua e na soja tostada. Ensaio de degradabilidade83

ARTIGO 2

Table 1.	Composition of the offered TMR, of the consumed diet, and of the refusals on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM) (% of DM). Experiment 1	122
Table 2.	Composition of feed samples (Mean±SD, n=4). Experiment 1	123
Table 3.	Diet NRC (2001) estimates based on animal response and intake of ingredients on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1	124
Table 4.	Diet CNCPS (AMTS v.3.4.6) estimates based on animal response and intake of ingredients on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1	125
Table 5.	Performance, milk (MUN) and plasma (PUN) urea-N, and intake on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1	126
Table 6.	Urinary volume, allantoin (Alla), uric acid (UA), and creatinine (Crea) on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1	127
Table 7.	Total tract apparent digestibility of nutrients (% of intake), plasma glucose, and digestible OM intake (DOMI) on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1	127

Table 8.	Plasma AA (g/100 g of plasma) on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1.....	128
Table 9.	Intake, diet and refusal composition during five days of feed bunk sampling of two barns on treatments Control or HMBi. Experiment 2.....	129
Table 10.	Performance of dairy cows on treatments Control or Met. Experiment 2.....	130
Table 11.	Plasma (PUN) and milk (MUN) urea nitrogen and the ratio of allantoin to creatinine in urine of dairy cows on treatments Control or Met. Experiment 2	130
Table 12.	Plasma AA (g/100 g of plasma) of dairy cows on treatments Control or HMBi. Experiment 2	131

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 15
2	REVISÃO DE LITERATURA 19
2.1	Proteólise e síntese de proteína ruminal 19
2.2	Precusores de metionina na nutrição animal 24
2.2.1	ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster 26
2.2.2	Absorção na parede ruminal 31
2.2.3	Ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster e seus efeitos no ambiente ruminal 33
2.3	Avaliação do ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster em fermentadores 34
2.4	Ensaio com uso de ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster em desempenho animal 35
2.5	isopropanol 43
2.6	Outros aminoácidos limitantes 45
	REFERÊNCIAS 48
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS 63
	ARTIGO 1 Resposta de vacas leiteiras à substituição de soja crua por soja tostada 63
	ARTIGO 2 <i>Methionine analog effect on performance, digestion, and plasma amino acids of dairy cows fed soybean diets</i> 89

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A consideração na nutrição proteica de ruminantes da absorção e da exigência nutricional por aminoácidos pode aumentar a eficiência de utilização do nitrogênio dietético e, assim, reduzir a emissão de amônia para o ambiente, induzir ganho financeiro por redução no uso de concentrados proteicos e melhorar o desempenho de vacas leiteiras (SCHWAB, 2010). Modelos nutricionais utilizados para a formulação de dietas estimam o desaparecimento da proteína e de aminoácidos do lúmen intestinal (metabolizáveis) e assumem que estes são utilizados com eficiência de conversão fixa para suportar funções metabólicas (FOX et al., 2004; INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA, 1989; NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001). Mesmo sabendo que os procedimentos matemáticos contidos nestes modelos são insuficientes para descrever a complexa biologia de ruminantes (DOEPEL et al., 2004; HANIGAN et al., 2006; LAPIERRE et al., 2006, 2012), estes têm sido considerados como de acurácia suficiente para direcionar a formulação de dietas para rebanhos leiteiros (PACHECO et al., 2012), apesar do uso prático das estimativas de fluxo de aminoácidos serem frequentemente questionadas (MULLINS et al., 2013). Segundo predições destes modelos, a metionina é o aminoácido mais limitante do desempenho leiteiro em dietas formuladas com grão e forragem de milho e soja e/ou concentrados proteicos de origem animal (exceto de peixe).

Geralmente, espera-se resposta positiva em teor e produção de proteína no leite ao maior suprimento dietético de metionina metabolizável, mas a resposta em desempenho não ocorre de forma consistente (PATTON, 2010; ROBINSON, 2010). A magnitude e a direção da resposta à suplementação com

metionina dependem da dieta basal (PHIPPS et al., 2008), do estágio da lactação (SCHWAB et al., 1992), do suplemento de metionina utilizado (PATTON, 2010), da ocorrência de outros nutrientes limitantes (BERTHIAUME et al., 2001), da capacidade sintética da glândula mamária (BURGOS; DAI; CANT, 2010; PROUD, 2007) e, provavelmente, de outros fatores fisiológicos e de manejo. O teor de aminoácidos no plasma tem sido utilizado para avaliar a resposta à suplementação com metionina, assumindo-se que esta variável representaria a disponibilidade de aminoácidos para os tecidos, principalmente, para a glândula mamária. O efeito da suplementação com metionina sobre o teor de aminoácidos no sangue arterial (LEE et al., 2012a; NOFTSGER et al., 2005; ORDWAY et al., 2009; SAINT-PIERRE; SYLVESTRE, 2005) é tão variável quanto o efeito sobre o desempenho animal.

A suplementação com metionina pode melhorar o desempenho de vacas leiteiras por mecanismo de ação ruminal (NOFTSGER et al., 2003; PLANK, 2011) ou sistêmico, comum a mamíferos (STIPANUK, 2004; WU, 2009). Williams e Moir (1951) observaram que ocorreu aumento na densidade bacteriana no rúmen em resposta à suplementação com metionina comparativamente à ureia, demonstrando, desde longa data, que bactérias ruminais podem se beneficiar do suprimento deste aminoácido. A eficiência de crescimento microbiano no rúmen pode ser aumentada pelo suprimento de vários aminoácidos, mas aminoácidos, também, podem ser inibitórios da síntese microbiana e o efeito inibitório de um aminoácido pode ser prevenido pela suplementação de outro aminoácido (FELICE et al., 1979; KAJIKAWA et al., 2005; KAJIKAWA; MITSUMORI; OHMOMO, 2002). Apesar de ter importância significativa na nutrição de ruminantes, a exigência nutricional de aminoácidos do rúmen é difícil de ser predita.

Algumas fontes de metionina têm sido avaliadas para ruminantes. Produtos baseados em metionina cristalina são mais rapidamente degradados no

rúmen do que o análogo sintético o ácido 2-hidróxi-4-metiltio-butírico (HMB) (BELASCO, 1980). Gil et al. (1973) observaram que HMB aumentou mais a taxa de digestão da celulose e do amido *in vitro* do que DL-metionina. O efeito mais consistente do HMB tem sido induzir aumento no teor de gordura do leite (ALMEIDA et al., 2010; CHANDLER et al., 1976; HUBER et al., 1984; LUNDQUIST; OTTERBY; LINN, 1985), sugerindo mecanismo de ação ruminal. O encapsulamento de DL-metionina, visando à sua proteção da degradação ruminal, é capaz de suprir metionina metabolizável para a glândula mamária (LAPIERRE et al., 2012; PATTON, 2010; ROBINSON, 2010).

O éster isopropílico de HMB, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster (HMBi) é considerado como sendo 50% menos degradado no rúmen do que HMB (GRAULET; RICHARD; ROBERT, 2005; NOFTSGER et al., 2005; ROBERT; RICHARD; BOUZA, 2001) e tem custo inferior ao da metionina encapsulada. Após a ingestão, o HMBi é hidrolisado a HMB e isopropanol por metabolismo ruminal e durante a absorção pela parede do rúmen (BREVES et al., 2010; McCOLLUM et al., 2000). Muito pouco HMB ou HMBi é encontrado no fluido omasal (NOFTSGER et al., 2005) e só se detecta HMB no sangue após a oferta de HMBi no rúmen (GRAULET; RICHARD; ROBERT, 2005). Parte do HMB liberado no rúmen é convertido em metionina por oxidação, seguida por transesterificação (DIBNER; KNIGHT, 1984) e pode ser incorporado na proteína microbiana (PATTERSON; KUNG JUNIOR, 1988; PLANK, 2011). Assume-se que o isopropanol é rapidamente absorvido pela parede do rúmen e é oxidado à acetona pelo fígado (GRAULET; RICHARD; ROBERT, 2005), podendo esta retornar ao rúmen, onde é novamente reduzida a isopropanol (BRUSS; LOPEZ, 2000). O isopropanol inibiu a produção de metano em sistema anaeróbico, para tratamento de dejetos industriais (INCE et al., 2011) e pode ser tóxico à célula microbiana, principalmente, por danificar a função da parede celular (EZEJI et al., 2010). Ao longo de sucessivas reciclagens entre o

sangue e o rúmen, a acetona é removida via leite, urina, respiração ou por conversão à glicose (BLACK et al., 1972). No sangue, o HMB pode ser convertido em metionina por vários tecidos de ruminantes (LOBLEY et al., 2006). A maioria do HMB que chega aos tecidos é convertido em metionina em vez de ser catabolizado (LAPIERRE et al., 2011). Cerca de 15% da metionina oriunda de HMB e incorporada na proteína do leite foi por conversão direta de HMB à metionina na glândula mamária ou em outros tecidos, enquanto o restante se originou indiretamente de HMB convertido à metionina para síntese proteica e posterior liberação e uso pela glândula mamária.

Tanto o HMB como o isopropanol podem afetar o metabolismo de microrganismos ruminais e, portanto, o mecanismo na resposta de vacas leiteiras à suplementação com HMBi. A resposta em desempenho de vacas leiteiras à suplementação com metionina é variável e dependente de fatores dietéticos e do animal.

Objetivou-se neste trabalho avaliar a resposta de vacas leiteiras alimentadas com soja como principal fonte proteica à suplementação com análogo de metionina (HMBi), enfatizando a função ruminal como mecanismo na resposta em teor de aminoácidos plasmáticos e desempenho leiteiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Proteólise e síntese de proteína ruminal

a) Proteólise ruminal

A taxa e extensão da proteólise no rúmen dependem de uma série de fatores, incluindo a solubilidade (tipo da proteína), o pH ruminal, o teor de amido dietético e a taxa de passagem da digesta. As enzimas proteolíticas, intra- ou extra-celulares, têm pH ótimo de ação entre 5,5 e 7,0, sendo a degradação proteica bastante reduzida quando o pH ruminal atinge valores abaixo de 5,5 (CARDOZO et al., 2000). Bactérias proteolíticas não são tão sensíveis a mudanças de pH quanto às celulolíticas. No entanto, a proteína nos alimentos pode estar revestida por outros compostos, como a celulose, que podem interferir na sua degradação por microrganismos do rúmen (ASSOUMANI et al., 1992). Logo, a manutenção de uma população ativa de bactérias celulolíticas pode aumentar a degradabilidade ruminal da proteína.

Embora a proteólise seja atribuída a uma grande variedade de microrganismos, as bactérias ruminais desempenham o papel mais importante, apresentando atividade de protease 6 a 10 vezes maior do que a dos protozoários (BROCK et al., 1982). Uma grande variedade de microrganismos proteolíticos interage para degradar a proteína dietética a oligopeptídeos, o primeiro passo na proteólise ruminal (FALCONER; WALLACE, 1998). As bactérias *Streptococcus bovis* e *Ruminobacter amylophilus* estão envolvidas na quebra de oligopeptídeos a dipeptídeos (WALLACE; McKAIN, 1991). A quebra de dipeptídeos e tripeptídeos a aminoácidos ocorre, principalmente, por ação das espécies *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella spp.* e *Lachnospira multiparus* (WALKER; NEWBOLD; WALLACE, 2005). Na última etapa da degradação

proteica, os aminoácidos são clivados a amônia (NH_3), por várias espécies de bactérias e protozoários (BRODERICK; WALLACE, 1988).

Os protozoários desempenham papel menor na degradação de partículas no rúmen (HINO; RUSSELL, 1987), mas são capazes de fagocitar proteína insolúvel (WALKER; NEWBOLD; WALLACE, 2005). Os protozoários predam bactérias ruminais como sua principal fonte proteica e utilizam aminoácidos dietéticos em menor proporção (FIRKINS; YU; MORRISON, 2007). A predação de bactérias por protozoários recicla aminoácidos e peptídeos para o rúmen (HOOVER; STOKES, 1991), o que suporta o crescimento de outros microrganismos ruminais (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005).

A NH_3 é, geralmente, produzida no rúmen a uma taxa superior à capacidade de sua incorporação à proteína microbiana, sendo o excesso absorvido e transportado para o fígado. No fígado, a NH_3 é convertida em ureia, e entre 40 e 80% do N-ureico sintetizado no fígado retorna ao trato digestivo em ruminantes (LAPIERRE; LOBLEY, 2001). O N-ureico do sangue que retorna ao rúmen é convertido em NH_3 e CO_2 por ureases bacterianas. A NH_3 produzida na quebra da proteína dietética e oriunda do N-ureico reciclado do sangue para o rúmen pode se acumular nas células microbianas (RUSSELL; STROBEL, 1987), e bactérias ruminais a assimilam em aminoácidos (WALKER; NEWBOLD; WALLACE, 2005). A proporção da proteína microbiana originada da síntese de novo de aminoácidos a partir de NH_3 foi reduzida em bactérias ruminais celulolíticas (ATASOGLU; NEWBOLD; WALLACE, 2001) e não celulolíticas (ATASOGLU et al., 1998) quando o meio de cultivo foi suplementado com aminoácidos e peptídeos. Aminoácidos pré-formados podem ser incorporados na proteína microbiana, reduzindo a necessidade de síntese *de novo*.

b) Estímulo, inibição e antagonismo do crescimento microbiano por aminoácidos

Como os microrganismos ruminais podem sintetizar aminoácidos a partir de esqueletos de carbono e NH_3 (LOOSLI et al., 1949; VIRTANEN, 1966), estes supostamente não têm exigência nutricional por aminoácidos. Entretanto, pode ocorrer aumento na produção microbiana, na eficiência (g de bactéria/g de substrato) e na taxa de crescimento quando aminoácidos são suplementados ao fluido ruminal (ARGYLE; BALDWIN, 1989; KESSEL; RUSSELL, 1996; KAJIKAWA; MITSUMORI; OHMONO, 2002).

Kajikawa, Mitsumori e Ohmono (2002) detectaram aumentos de 46% na taxa de crescimento e de 15% na eficiência de síntese microbiana quando uma mistura de 20 aminoácidos foi acrescida em meio de cultivo contendo bactérias ruminais, glicose, xilose e celobiose. Entretanto, não foi observado efeito positivo sobre o crescimento microbiano, quando cada um destes aminoácidos foi acrescido, isoladamente, ao meio de cultivo, exceto para glutamato e glutamina, que induziram pequeno estímulo ao crescimento. O efeito estimulatório da mistura de aminoácidos sobre o crescimento microbiano foi reduzido quando leucina, tirosina, triptofano, glutamato, metionina, fenilalanina e valina foram removidos da mistura. Quando uma mistura apenas destes sete aminoácidos foi suplementada, o efeito estimulatório sobre a taxa de crescimento e a eficiência de síntese microbiana foi de 21% e 25%, respectivamente, do estímulo induzido pela mistura dos 20 aminoácidos. O efeito positivo da mistura de aminoácidos, sobre o crescimento microbiano, foi aparentemente mediado pela redução no gasto energético de manutenção das bactérias. Entretanto, tanto a taxa quanto a eficiência de síntese microbiana foram inibidos pela adição única de isoleucina, treonina, cisteína, fenilalanina, leucina, lisina e valina a meio de cultivo contendo apenas nitrogênio amoniacal como fonte de N. Os resultados sugerem que deficiências ou excessos de

aminoácidos específicos deveriam ser considerados, quando se objetiva atuar sobre o crescimento de microrganismos ruminais via manipulação do suprimento dietéticos, já que aminoácidos podem induzir estímulo ou inibição da síntese microbiana.

O crescimento de vários microrganismos pode ser inibido, quando o meio contém alguns aminoácidos, e esta inibição pode ser revertida pela inclusão de outros aminoácidos. Kajikawa et al. (2005) observaram que a inibição do crescimento microbiano por isoleucina, fenilalanina e treonina foi antagonizada pelo suprimento de leucina, valina, tirosina, triptofano ou glutamina. Supõe-se que a explicação mais plausível para o efeito inibitório de alguns aminoácidos sobre a síntese microbiana seria por inibição por *feedback* da enzima inicial da rota metabólica de síntese do aminoácido (FELICE et al., 1979). Secundariamente, esta inibição, também, deprimiria a produção de outros aminoácidos que requerem esta mesma enzima para sua síntese. Neste caso, o suprimento de aminoácidos inibidos, secundariamente, teria efeito antagônico ao aminoácido inibidor, removendo sua ação depressora sobre o crescimento microbiano. Quando um aminoácido tem efeito inibitório sobre a síntese de proteína microbiana no rúmen, uma nova exigência nutricional por outro aminoácido será criada. Quando a dieta é rica no aminoácido inibidor, a suplementação do antagonista pode ser necessária.

c) Síntese de metionina por microrganismos

A metionina pode ser sintetizada por microrganismos a partir de homoserina e enxofre inorgânico (RAVANEL et al., 1998). Existem duas vias de síntese de metionina: a transulfuração, que utiliza cisteína como fonte de enxofre e passa por cistationina como composto intermediário, e a via da sulfidrilção direta que não passa por cistationina utilizando enxofre inorgânico como fonte direta de enxofre (Figura 1).

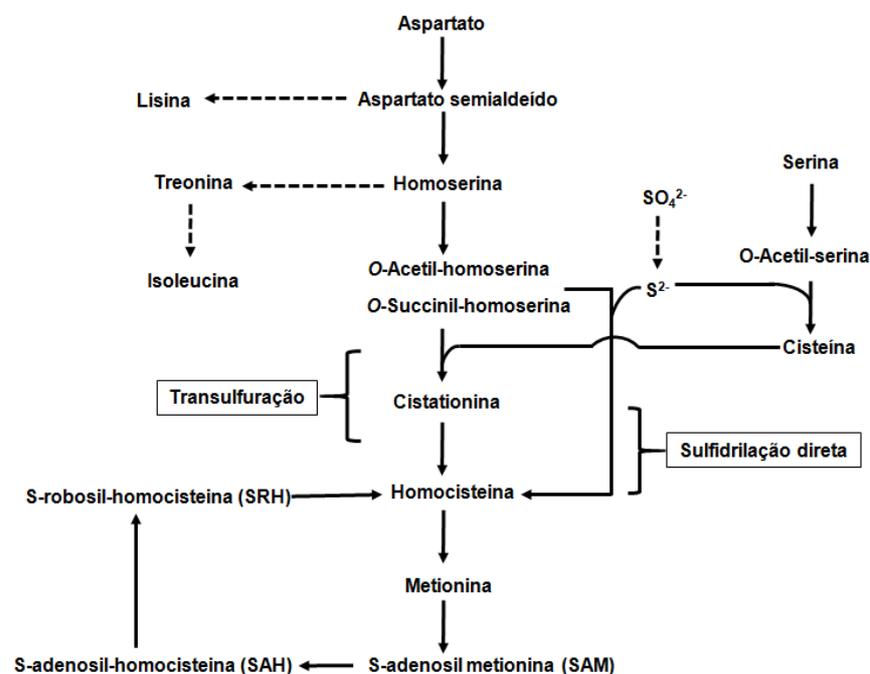


Figura 1 Síntese de metionina por bactéria: vias de sulfidrilização e transulfuração

Or-Rashid et al. (2001) avaliaram a biossíntese de metionina *in vitro* por bactérias ruminais, protozoários e uma mistura de bactérias e protozoários em meios de cultivo contendo homocisteína, cistationina ou homoserina mais cisteína. O desaparecimento dos precursores ocorreu em todos os três meios. A produção de metionina foi maior no meio contendo bactérias, seguido pelo meio com bactérias e protozoários, sendo menor no meio contendo apenas protozoários. A incorporação de metionina nas células microbianas seguiu o mesmo padrão, não ocorrendo incorporação significativa nas células de protozoários, que liberaram a metionina no meio de cultivo. Protozoários do rúmen obtêm a maioria de seus aminoácidos a partir da fagocitose de bactérias.

2.2 Precursores de metionina na nutrição animal

Precursores de metionina têm sido utilizados na nutrição de ruminantes e de monogástricos como forma de suprir a demanda nutricional por metionina (MARTÍN-VENEGAS; GERAERT; FERRER, 2006). No HMB (ácido 2-hidróxi-4-metiltio-butírico) um grupamento hidroxila substitui o grupamento amino da metionina, sendo uma fonte sintética de metionina para animais. A conversão de D e L HMB em L-metionina ocorre por oxidação do carbono alfa a ácido 2-ceto-4-(metiltio) butanoico ou ceto-metionina (KMB), seguido por transaminação do KMB a L-metionina (DIBNER; KNIGHT, 1984).

Diferentes enzimas catalisam a oxidação dos estereoisômeros L e D de HMB a KMB (Figura 2). A enzima específica para L-HMB é a L-2-hidroxi ácido oxidase (L-HAO), encontrada nos peroxissomos do fígado e rins, enquanto a D-HMB requer a enzima mitocondrial D-2-hidroxi ácido desidrogenase (D-HADH) encontrada em vários tecidos (DIBNER; KNIGHT, 1984). O KMB é então transaminado a L-metionina, tendo isoleucina, leucina e valina como principais doadores do grupamento amino em aves, e a glutamina o principal doador em ratos (BAKER, 1994).

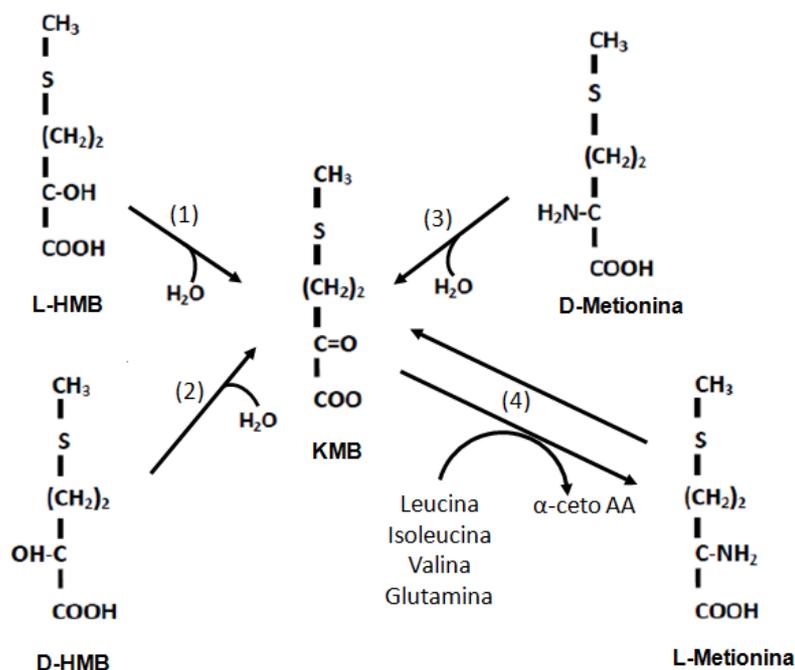


Figura 2 Bioconversão dos isômeros L e D do ácido 2-hidroxi-4-metilto butírico (L-HMB e D-HMB) ou D-metionina (D-Met) em ácido 2-ceto-4- metilitio butírico (KMB) e este a L-metionina (L-Met)

Quando HMB marcado com ¹⁴C foi infundido no rúmen, o marcador foi incorporado na fração sólida da digesta em CO₂ e em ácidos graxos voláteis, principalmente propionato (BELASCO, 1980). No rúmen, a conversão de HMB em metionina envolve a ação da enzima transferase de aminoácidos ramificados na transaminação de KMB a L-metionina (Figura 2). O enriquecimento de ¹³C, oriundo de metionina na metionina microbiana, foi menor com L-metionina do que com precursores de metionina HMB e HMBi, sugerindo que os tratamentos determinaram a incorporação de metionina pré-formada na proteína microbiana (PLANK, 2011).

Especificamente em vacas leiteiras, Belasco (1980) utilizou carbono marcado para comparar metionina e HMB em vacas fistuladas, que após os tratamentos foram abatidas para a avaliação. Com uso de HMB verificaram-se duas a três vezes mais radioatividade no leite, tecidos, sangue e excreta e aparentemente mais metionina marcada no sangue, leite, urina, fígado e rins, evidenciando a biotransformação de HMB para metionina em ruminantes.

Em trabalho básico com carbono marcado, Belasco (1972) já havia demonstrado que frações microsomais de fígado e rins de bezerro foram capazes de sintetizar metionina a partir de HMB na presença de glutamina, leucina e asparagina como grupo metil doador. McCollum et al. (2000) verificaram em ovinos que as enzimas envolvidas na conversão de HMB para KMB foram detectadas em células de fígado, rins, epitélio ruminal e omasal, sendo a capacidade do fígado em converter HMB para o intermediário ceto-metionina da mesma ordem de grandeza que o observado em frangos.

2.2.1 ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster

O éster isopropílico de HMB, o ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster (HMBi), de fórmula química $\text{CH}_3\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{COO}-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$, teve a patente nos EUA, registrada em 12 de novembro de 1999, sendo concedida em 24 de abril de 2001 (DEPARTMENT OF COMMERCE USA, 2013). Na Europa, o pedido de uso do produto foi realizado em 22 de fevereiro de 2002, junto à Diretoria Geral de Saúde e Proteção ao Consumidor da Comissão Europeia pela *Aventis Animal Nutrition* (atualmente ADISSEO), tendo seu uso aprovado em 25 de abril de 2003, conforme decisão do Comitê de Nutrição Animal (EUROPEAN COMMISSION, 2003). Seguindo as orientações da Diretiva 82/471/EEU, o produto destina-se ao balanceamento de dietas

deficientes em metionina para vacas leiteiras, sendo a recomendação de consumo de 25 a 30g/dia (EUROPEAN COMMISSION, 2003).

O HMBi é uma molécula sintética, produzida a partir de propileno, metilmercaptano, cianeto, ácido sulfúrico e 2-propanol. Duas rotas químicas de fabricação são descritas, diferindo apenas na etapa final da síntese (Figura 3). Nas etapas comuns, o propileno (I) é inicialmente oxidado a acroleína (II) e, em seguida, condensado com metilmercaptano (III), originando o mercaptopropionaldeido metil (IV). O mercaptopropionaldeido metil é reagido com cianeto (IV), formando o 2-hidroxi-4-(metiltio) butanonitrilo (V). Na etapa final via rota 1, o 2-hidroxi-4-(metiltio) butanonitrilo é convertido diretamente a HMBi por reação com ácido sulfúrico e 2-propanol. Na rota 2, ocorre primeiro a acidificação do 2-hidroxi-4-(metiltio) butanonitrilo por ácido sulfúrico, produzindo o ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutirico (HMB) e a partir destes, após a incorporação do 2-propanol, obtém-se o seu éster isopropil. O material resultante é um líquido incolor a ligeiramente acastanhado, com densidade de 1,074, e solúvel em água (25,1g/L a 30°C).

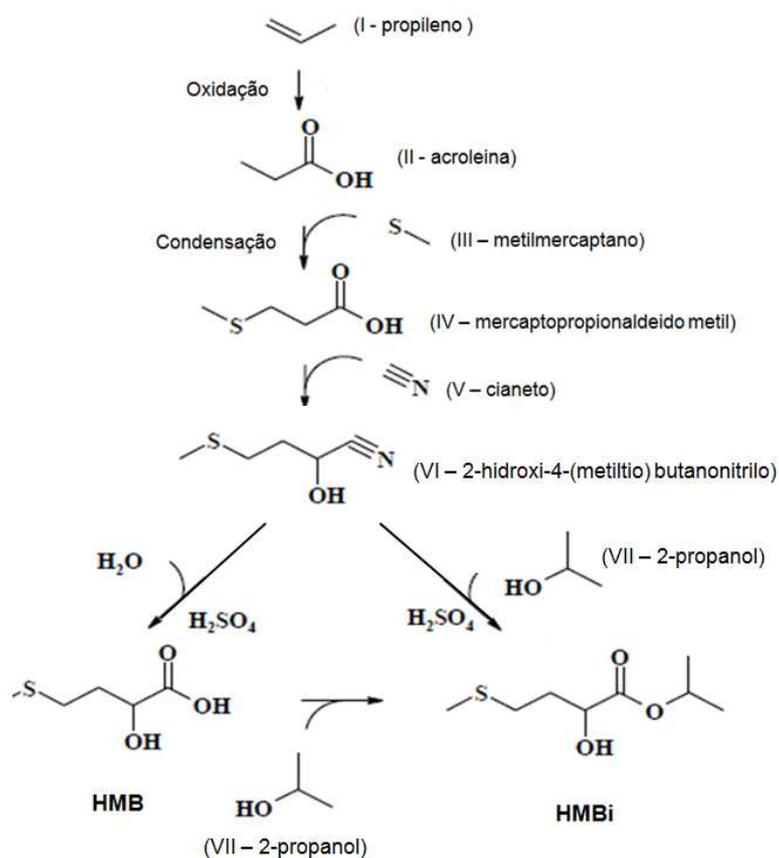


Figura 3 Reações químicas para obtenção do ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutírico (HMB) e o ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster (HMBi)

A possibilidade de efeito positivo sobre a produção de leite da suplementação em dietas de vacas leiteiras com precursores de metionina é conhecida de longa data (GRIEL et al., 1968). Polan, Chandler e Miller (1970), ao testarem doses entre 0 e 80 g/dia, verificaram efeito quadrático em produção de leite, com resposta máxima com consumo de 25g/dia. O aumento do crescimento de bactérias ruminais *in vitro*, com uso de metionina e ácido 2-

hidroxi-4-metiltiobutirico (HMB), em comparação ao meio com ureia como fonte de nitrogênio, foi verificado por Gil et al. (1973).

Belasco (1980), utilizando HMB com carbono marcado, em comparação à metionina, também, marcada radioativamente, verificou que o HMB apresentou menor perda por respiração de CO₂, menor radiatividade no sólido ruminal e ácidos graxos voláteis e foi degradado mais lentamente no fluido ruminal do que a metionina. Os resultados indicaram que a metionina ou seus metabólitos foram incorporados a células microbianas ruminais em maior quantidade do que o HMB. Os compostos foram descarboxilados rapidamente e incorporados diretamente na proteína microbiana ou parte do carbono marcado descarboxilado foi incorporado aos componentes microbianos. A maior resistência à biodegradação ruminal com HMB pode ter fornecido precursor de metionina para os tecidos, uma vez que a suplementação com o análogo resultou em 2 a 3 vezes mais radiatividade no leite, tecidos, sangue e excreta, sugerindo que o hidroxi análogo foi utilizado mais eficientemente que a metionina em vacas leiteiras.

Patterson e Kung Junior (1988) avaliaram *in vitro* a degradação da DL-metionina, HMB e seus análogos éster metil, éster etil, sal de amônio e amida por microrganismos ruminais. O desaparecimento de HMB foi mais lento que o da metionina. Os análogos com sal de amônio e amida foram degradados mais lentamente que a metionina. No entanto, os ésteres metil e etil foram rapidamente convertidos a HMB e, então, degradados. Neste trabalho, utilizando carbono marcado e avaliando seu desaparecimento no meio, ao longo da incubação, sugerem que as bactérias e protozoários podem estar igualmente envolvidos na degradação de HMB e metionina e que as bactérias podem incorporar estes compostos marcados em maior extensão. A menor incorporação de carbono marcado no material celular não significa necessariamente que a metionina e o HMB não estimulem o crescimento de protozoários. Apesar de

não ser o único modo de ação possível, a metionina e, presumivelmente, HMB atuam como doadores de metil por uma série de reações, incluindo a síntese de colina, podendo estimular o crescimento de protozoários (PATTERSON; KUNG JUNIOR, 1988).

Em virtude da menor degradação ruminal do HMB em comparação à DL-metionina, seu uso na suplementado para ruminantes tem sido definido por atuar positivamente no rúmen e/ou por absorção pós ruminal do análogo de metionina, sendo tema controverso na literatura. A degradação por fermentação ruminal tem sido estimada entre 21 a 50% do consumido (KOENIG et al., 1999; VÁZQUEZ-AÑÓN et al., 2001), apesar de existirem relatos de que mais de 99% seria degradado no rúmen (JONES et al., 1988) e, quando suplementado na forma líquida, verificou-se que menos de 5% do HMB chegam ao intestino de vacas leiteiras (NOFTSGER et al., 2005).

A suplementação de vacas leiteiras com HMB tem sido capaz de aumentar o teor de gordura do leite (ALMEIDA et al., 2010; HUBER et al., 1984; LUNDQUIST; OTTERBY; LINN, 1985), sugerindo que o mecanismo de ação para o efeito positivo seria por ação na fermentação ruminal (NOFTSGER et al., 2003), apesar de não ocorrer consistência nesta resposta (STOKES; CLARK; STEINMETZ, 1981). Verificou-se que a esterificação de DL-metionina e HMB com vários álcoois tem efeitos profundos sobre a degradação ruminal destas moléculas e comparativamente a metionina protegida ruminalmente, a biodisponibilidade foi aumentada com os correspondentes álcoois ramificados (ROBERT et al., 2001a).

Um novo hidróxi análogo de metionina, o ácido butanoico, 2-hidróxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster ou éster isopropílico do HMB (HMBi) tem sido proposto como suplemento para animais ruminantes. O HMBi apresentou entre 42 e 58% de biodisponibilidade em *pulse* dose ruminal (ROBERT et al., 2001a, 2001b) ou em bioensaio com vacas, utilizando a concentração de proteína do

leite como índice de biodisponibilidade (SCHWAB et al., 2001). A biodisponibilidade do HMBi foi independente do modo de fornecimento, seja na forma líquida ou como suplemento a seco usando pó de argila como veículo (ROBERT et al., 2002b). Entretanto, apenas 2,3%, da quantidade do HMBi consumida chegaram ao omaso de vacas leiteiras, demonstrando que ocorre metabolização ou absorção quase total da molécula no ambiente ruminal (NOFTSGER et al., 2005). Ao avaliar o HMBi *in vitro* ficou demonstrado que sua concentração foi reduzida, ao longo do tempo de fermentação, com aumento de HMB seguido do incremento nas concentrações de isopropanol e acetona, sendo o HMBi efetivamente hidrolisado a HMB e isopropanol por microrganismos ruminais (ROBERT et al., 2002a).

2.2.2 Absorção na parede ruminal

Visando compreender a absorção ruminal de HMBi, Graulet, Richard e Robert (2005) avaliaram a concentração plasmática de seus possíveis metabólitos (álcool isopropílico, acetona, HMB e metionina) após o fornecimento em dose única via cânula ruminal. O teor basal de HMB no plasma foi de $3,26 \pm 1,00 \mu\text{M}$, com aumento no teor do sangue periférico 10 min após o pulso intraruminal de HMBi, sendo observado o teor máximo 60 min após a infusão ($216,57 \mu\text{M}$). A resposta em teor plasmático de HMB ao suprimento intraruminal de HMBi, evidenciou que o HMBi foi capaz de induzir aumento no teor plasmático de HMB, fato não verificado no tratamento controle, onde o HMB foi infundido. Não foi avaliado pelos autores o local de metabolização de HMBi a HMB, se ocorreu no lúmen ou na parede do trato digestivo ou em outros órgãos. O pulso intraruminal de HMBi, também, induziu aumento no teor plasmático de álcool isopropílico 2 horas após o fornecimento, simultaneamente ao aumento no teor de acetona. Entretanto, a concentração de acetona no plasma

foi cerca de 10 vezes superior à do álcool isopropílico, sugerindo que a oxidação hepática de álcool isopropílico à acetona foi rápida (BRUSS; LOPEZ, 2000). O teor de metionina no plasma aumentou rapidamente nas primeiras 3 horas após o pulso intraruminal de HMBi, atingindo concentração sete vezes superior ao valor basal. Por avaliação da curva, descrevendo o teor plasmático de metionina, após a infusão única no rúmen, os autores propuseram que a estimativa da biodisponibilidade da metionina a partir de HMBi foi de $48,34 \pm 2,05$ % da dose fornecida, usando como base fonte de metionina protegida de fermentação ruminal comparada experimentalmente.

O potencial de absorção de HMBi intacto pela parede do rúmen foi avaliado por Breves et al. (2010) *in vitro* simulando o epitélio ruminal. Amostras de tecido epitelial do rúmen obtido de frigorífico separaram duas metades de uma câmara de incubação contendo soluções com tampões ruminal ou seroso. Dois teores de HMBi no tampão ruminal (0,44 ou 0,88 mg/mL) e dois tempos de incubação (120 ou 180 min) foram avaliados. As concentrações de HMBi e HMB foram analisadas nas duas soluções tampão. A adição de HMBi ao tampão ruminal induziu acúmulo imediato de HMB nesta solução tampão, relativo a 6,8% do HMBi adicionado, indicando que ocorreu rápida hidrólise do HMBi, coerente ao observado *in vivo* (GRAULET; RICHARD; ROBERT, 2005). Em média, 0,58% do HMBi adicionado ao tampão ruminal foi transferido para o tampão seroso, enquanto a transferência de HMB foi de 8,94%. O aumento no tempo de incubação aumentou a quantidade de HMB no tampão seroso e reduziu a quantidade de HMBi. Os dados sugerem que muito pouco HMBi passa pelo epitélio do rúmen. Aparentemente, parte do HMBi é hidrolisado a HMB na superfície do tecido e durante o transporte pelo epitélio do rúmen. Como não são conhecidas esterases no epitélio ruminal, a hidrólise de HMBi a HMB pode ocorrer por ação microbiana na superfície do epitélio (GRAHAM; SIMMONS, 2005). A transferência de HMB do rúmen para o sangue pode ocorrer por

difusão passiva ou por sistema transporte (KIRAT et al., 2006), ambos dependentes de gradiente de concentração entre a mucosa e o lado seroso do tecido.

2.2.3 Ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster e seus efeitos no ambiente ruminal

Noftsgger et al. (2005) avaliaram em vacas leiteiras as respostas de uma dieta controle com 18,4% de PB (com estimativa de 1,8% de metionina na proteína metabolizável) comparada a dietas suplementadas com HMB (0,10%), HMBi (0,13%) ou DL-Metionina (0,088%) (% do CMS). Nos parâmetros ruminais pH, NH₃, total de ácidos graxos voláteis, concentrações de acetato propionato, butirato, valerato, isobutirato, isovalerato e na relação acetato:propionato não foram verificadas diferenças significativas, indicando que nessas condições experimentais nenhuma das fontes de metionina suplementar afetou estes parâmetros. Na digestibilidade *in vivo*, as dietas suplementadas com metionina aumentaram a digestibilidade aparente da matéria orgânica e da FDN ruminal em comparação ao controle e sem diferenças entre si. Entretanto, não foram detectadas diferenças na digestibilidade verdadeira da matéria orgânica no rúmen e nas digestibilidades das matérias seca e orgânica no trato total. Na degradabilidade ruminal *in situ*, o HMBi reduziu a degradabilidade efetiva da FDN da silagem de milho em comparação aos tratamentos controle e HMB. Entretanto, não foram verificados efeitos na degradabilidade da FDN do feno de alfafa e na amostra da dieta completa.

Usando cabras fistuladas como modelo, Feng et al. (2013), avaliando os efeitos do HMBi sobre os parâmetros de fermentação ruminal, testaram os níveis de inclusão: 0; 0,85; 1,27 e 1,70 % MS dietéticas de MetaSmart (Adisseo, França). Os tratamentos com HMBi aumentaram o pH médio do rúmen para

6,43 em comparação ao controle (pH = 6,30), sem diferenças entre as doses com análogo de metionina. O uso de HMBi reduziu a concentração de N-amoniacal no rúmen (12,85 HMBi *versus* 17,63 mg/100 mL de fluido ruminal do controle) e aumentou a concentração total de ácidos graxos voláteis e acetato (mmol/L) independente da dose testada em relação ao controle, indicando alterações no ambiente ruminal com uso de HMBi.

2.3 Avaliação do ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster em fermentadores

Fowler et al. (2010) testaram o uso de HMBi em sistema fermentador contínuo, comparando os tratamentos: sem suplemento (controle), 0,11 % de HMBi; 0,097 % de DL-Metionina e 0,055 % de HMBi + 0,048 % de DL-Metionina (na MS dieta) em dietas com 14,2 % de PB e 7,8 % de proteína degradável no rúmen (PDR). O fornecimento de HMBi reduziu a digestibilidades da FDN e hemicelulose, sem efeito sobre a síntese de proteína microbiana e nas digestibilidades da FDA e matéria orgânica verdadeira. A concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) nos fermentadores foi reduzida de forma quadrática ($P=0,08$) e a concentração de peptídeos ($P=0,04$) aumentou linearmente com o uso de HMBi. Correspondentemente, o nitrogênio bacteriano oriundo de N-NH₃ aumentou linearmente ($P=0,02$), indicando um redirecionamento da síntese *de novo* de aminoácidos, quando HMBi foi adicionado, com menor degradação de peptídeos. Além disso, verificou-se redução na produção total de ácidos graxos e de acetato de forma linear com HMBi substituindo DL-Metionina, demonstrando um efeito específico do precursor de metionina na alteração de populações de microrganismos ruminais.

Nobari et al. (2013), também, testaram *in vitro* o uso de HMBi e DL-Metionina em dietas formuladas com diferentes níveis de proteína bruta (17,7

versus 15,7 % PB na MS) e proteína degradável no rúmen (10,5 e 9,3 % de PDR na MS), com teores semelhantes de FDN, FDA e isoenergéticas. Os tratamentos em cada nível de proteína bruta foram: sem suplemento (dieta controle); 0,065 % HMBi; 0,13 % HMBi ou 0,088 % DL-Metionina na matéria seca dietética. Os resultados das digestibilidades de FDN, FDA e hemicelulose apresentaram interação significativa entre as fontes de metionina e níveis de proteína bruta da dieta ($P < 0,001$). Na dieta com 17 % de PB a digestibilidade da hemicelulose foi reduzida com uso de DL-Metionina e as dietas suplementadas com HMBi foram semelhantes ao controle. Entretanto, na dieta com menor teor de proteína a suplementação com análogo de metionina reduziu a digestibilidade para 49,97 % e 51,75 % nas dietas com 0,065 % e 0,13 % de HMBi, respectivamente, em comparação a 61,35 % observado na dieta controle. O pH do meio não foi afetado por nenhum dos tratamentos dietéticos. A concentração de N-amoniaco (mg/dL) foi linearmente reduzida com uso de HMBi, sem interação entre fonte de metionina e nível de proteína bruta dietética.

2.4 Ensaios com uso de ácido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster em desempenho animal

Noftsgger et al. (2005), comparando dietas com 18,4 % de PB suplementadas com HMB (0,10 %), HMBi (0,13 %) ou DL-Metionina (0,088 %) (% do consumo de matéria seca) não verificaram diferenças no consumo de matéria seca (CMS) (20,1 kg/dia), produção de leite (37,7 kg/dia), teor de gordura (3,42 %), teor de lactose (4,86 %) e no nitrogênio ureico no leite (13,8 mg/dL). Entretanto, o uso de DL-metionina tendeu a reduzir a produção de leite (-2,5 kg/dia, $P=0.06$) comparado aos outros três tratamentos. O teor de proteína no leite aumentou com uso de HMBi (3,02 %) em relação ao controle (2,91 %) e HMB (2,95 %), mas sem efeito sobre a quantidade de proteína entre estes.

Embora tenha sido verificado aumento no teor de proteína do leite, a concentração de metionina no plasma não foi alterada com a suplementação de HMBi. Também não foram identificadas diferenças para nenhum dos demais aminoácidos essenciais e o único aminoácido não essencial afetado pelos tratamentos foi a taurina. A inclusão de HMBi na dieta reduziu a concentração plasmática de taurina em comparação aos tratamentos controle e HMB, mas sem diferenças para a dieta com DL-metionina.

Saint-Pierre e Silvestre (2005), objetivando avaliar os efeitos separadamente e conjuntamente do uso de HMB e HMBi, realizaram experimento contínuo por 16 semanas, iniciado logo após o parto (entre 21-28 dias). Os quatro tratamentos dietéticos com 16,6% de PB foram: dieta basal; HMB (0,10%); HMBi (0,15%) ou HMB (0,045%)+HMBi (0,15%) (% de MS dieta). A suplementação com precursores de metionina visou adequar a estimativa da relação lisina:metionina na proteína metabolizável da dieta basal de 3,8:1 para 3,0:1. Na dieta com HMBi (fonte única de metionina) foi verificado aumento na produção de leite (+2,5 kg/dia), teor (+0,16 %) e quantidade de proteína (+126 g/dia), quantidade de gordura (+218 g/dia) e quantidade de lactose (+182 g/dia) em comparação ao controle. Mas o fornecimento de HMB não apresentou efeitos significativos na produção e composição do leite em relação ao controle. E a suplementação de HMB+HMBi não determinou ganhos em produção de leite ou sólidos em relação ao tratamento com HMBi. Houve interação significativa dos efeitos de HMB e HMBi apenas em teor de lactose e nitrogênio ureico do leite. Os tratamentos com HMBi reduziram o nitrogênio ureico do leite, mas esse efeito não foi observado no nitrogênio do plasma. A metionina livre no plasma, como proporção do total de aminoácidos essenciais, aumentou com uso de HMBi, mas não com HMB. Os ganhos em desempenho indicam que, nestas condições experimentais, o HMBi estaria fornecendo ao rúmen quantidade suficiente de

HMB para maximizar a produção, e que os ganhos adicionais em relação ao HMB devem ser em decorrência da absorção de parte do HMBi e seu uso plasmático.

Também com objetivo de adequar a relação lisina: metionina na proteína metabolizável de vacas leiteiras, mantidas em pastagem tropical e suplementadas com concentrado, Greco (2008) incluiu 0,2% de HMBi na MS do concentrado, sendo fornecido na proporção de 1 kg de concentrado para cada 3 kg de leite produzido. A suplementação com HMBi não apresentou efeitos na produção, nos teores de sólidos e no nitrogênio ureico no leite. Vacas em lactação, mantidas em pastagens tropicais com alto teor de proteína bruta, no terço médio e final de lactação, com produções ao redor de 16 kg de leite não responderam à suplementação de HMBi.

Rulquin et al. (2006), também, com a estratégia de adequar a relação lisina:metionina na PM, avaliaram fontes de metionina em dietas de vacas confinadas com produção diária de 32 kg de leite. Neste ensaio, a dieta controle (sem fontes de metionina) foi comparada com dietas suplementadas com, aproximadamente, 10 gramas/vaca/dia de metionina absorvível com uso de HMB, HMBi (ambos na forma líquida) ou metionina com proteção ruminal (Smartamine M). A suplementação com fontes de metionina não afetou o consumo de matéria seca, produção de leite e leite corrigido para 4 % de gordura. O uso de HMBi aumentou o teor (+0,10 %) e a quantidade de proteína (+32 g/dia) no leite em comparação ao tratamento sem suplementação, mas sem diferenças para a dieta com metionina protegida. Os tratamentos não afetaram o teor e a quantidade de gordura, entretanto o HMBi reduziu teores dos ácidos graxos C6:0, C8:0, C10:0 e C12:0 e C14:0 no leite comparado aos outros três tratamentos. O HMB e HMBi promoveram aumento no teor do ácido graxo C15:0 do leite comparado aos tratamentos controle e metionina protegida, indicando estimulação no crescimento de microrganismos, considerando este

ácido graxo como marcador ruminal (VLAEMINCK et al., 2006). As três fontes de metionina suplementadas promoveram aumento no teor do ácido graxo C18:0 e redução no teor de C18:2 em relação ao controle. Não foram detectadas diferenças entre os tratamentos nos metabólitos plasmáticos glicose, ácidos graxos não esterificados (NEFA), triacilgliceróis, beta-hidroxibutirato (BHBA) e ureia. O HMBi aumentou a concentração plasmática de metionina em comparação à metionina protegida, e esta foi superior ao controle e HMB, indicando ganho global em metionina para o animal superior a quantidade potencial de metionina pós ruminal da absorção da fonte protegida. Nestas dietas deficientes em metionina, o HMBi se equivaleu à fonte de metionina protegida na síntese de proteína no leite, ao contrário do observado com o HMB.

Também, comparando o HMBi com uma fonte de metionina protegida, Ordway et al. (2009) avaliaram os efeitos da suplementação iniciada antes do parto. Foram comparados três tratamentos: dieta basal (controle negativo, sem suplementação); 0,35 % no pré-parto + 0,54 % pós-parto de MetaSmart (HMBi) ou 0,06 % no pré-parto + 0,10 % no pós-parto de Smartamine M (metionina rúmen protegida) expressos como % na MS da dieta. Os níveis de suplementação foram propostos para atingir relação lisina metionina de 3:1 na PM em contraste à dieta basal que apresentava relação 3,6:1. No período do pré-parto, iniciado 21 dias antes da data prevista para o parto, não foram verificadas diferenças no consumo de matéria seca (13,5 kg/dia), peso corporal (687 kg) e escore de condição corporal (3,81) entre tratamentos. E, durante o pós-parto, avaliado por 20 semanas, também não houve efeito dos tratamentos na produção de leite (43,0 kg/dia), produção de gordura (1549 g/dia), teor de gordura (3,66 %), produção de proteína verdadeira (1192 g/dia) e nitrogênio ureico no leite (12,9 mg/dL). No pós-parto o MetaSmart aumentou o consumo de matéria seca (CMS) e o escore de condição corporal (ECC), e reduziu as eficiências leite:CMS e N no leite: N dietético comparado às dietas controle e Smartamine

M. O teor de proteína do leite foi maior para o Smartamine M (2,87 %) sem diferenças para o MetaSmart (2,81 %) e estes superiores ao tratamento controle (2,72 %). Foi verificada diferença nas concentrações plasmáticas de metionina e metionina+cisteína entre tratamentos, com maiores valores para a Smartamine M, seguido pelo MetaSmart e com menores valores no tratamento controle. Os resultados indicaram que MetaSmart e Smartamine M foram eficazes no fornecimento de metionina na proteína metabolizável, verificado pelo teor de proteína no leite, mas por mecanismos diferentes já que houve alteração no consumo nesta dieta com 16,4% de PB no pós - parto.

Dalbach et al. (2011) avaliaram os possíveis efeitos de HMBi no pós-parto imediato e testaram a inclusão de 2,6g/kg de MS de HMBi iniciado no dia do parto em comparação ao controle (não suplementado). As avaliações de desempenho e metabolismo esplâncnico de aminoácidos foram realizadas nos dias 4, 15 e 29 pós-parto. Não foram verificadas diferenças significativas no CMS, produção e composição de leite com a suplementação de HMBi. Entretanto, foi verificado aumento de metionina arterial com quatro dias de inclusão dietética, demonstrando sua rápida ação como fonte de metionina metabolizável no pós-parto de vacas leiteiras. No entanto, a resposta da suplementação com HMBi não persistiu e diminuiu com o tempo, e a metionina arterial das vacas do tratamento com HMBi não diferiu do controle na avaliação com 29 dias após o parto, sugerindo adaptação do metabolismo dos tecidos ao aumento da oferta de metionina. Os autores verificaram que a suplementação com HMBi não aumentou o fluxo portal líquido ou o fluxo esplâncnico líquido de metionina. Pelo contrário, observou-se tendência para aumento da captação hepática de metionina, indicando diminuição aparente na produção splâncnica líquida de metionina com uso do HMBi. Esses efeitos foram correlacionados com a tendência de aumento no teor de gordura do leite ($P=0,07$) com uso de HMBi. Quantidades substanciais de fosfatidilcolina são secretadas na membrana

do glóbulo de gordura do leite, e respondem por, aproximadamente, 30% de fosfolípidos (KANNO, 1990) e o fornecimento de metionina poderia repor o *pool* de grupo metil. Embora uma substancial remetilação de homocisteína ocorra (LOBLEY; CONNELL; REVELL, 1996) e as fontes de carbono para essa remetilação estejam disponíveis em forma de serina e glicina (e talvez também histidina), especulou-se que o esgotamento de metionina no pós-parto poderia estar limitando as reações de transmetilação, uma vez que pouca metionina estaria disponível para a síntese de S-adenosilmetionina, apesar da abundante disponibilidade de fontes metil.

Os níveis plasmáticos de serina e glicina aumentaram após o parto e, portanto, as vacas não apresentariam falta de fontes de grupos metil para remetilação, mas a redução nas concentrações arteriais desses dois aminoácidos com a suplementação HMBi pode indicar seus maiores usos como metil doadores com aumento do *status* de metionina. Fato que foi confirmado pelo aumento das taxas de extração hepática de serina e histidina com uso de HMBi em comparação com o controle, indicando resposta hepática ativa na diminuição das concentrações arteriais. A tendência de redução da concentração de histidina como resposta à suplementação HMBi concorda com o mecanismo proposto anteriormente (SCHWAB et al., 1992) em que o aumento no *status* de metionina aumenta a utilização de outros aminoácidos essenciais. Já o fluxo esplâncnico líquido de leucina tendeu a ser maior com o uso do HMBi, provocado pela diminuição da extração pelo fígado. Isso concorda com as observações de Berthiaume et al. (2006), onde o aumento das doses de metionina protegida aumentou o fluxo esplâncnico de leucina, bem como outros AA de cadeia ramificada. Os aminoácidos de cadeia ramificada, geralmente, são catabolizados em menor quantidade pelo fígado em comparação com outros aminoácidos essenciais (REYNOLDS, 2006). A descarboxilação de α -cetoácidos de cadeia ramificada pelo complexo desidrogenase de α -cetoácido de cadeia ramificada é

um passo limitante da velocidade na via catabólica que é compartilhado por toda a cadeia de α -cetoácidos ramificada e, também, do α -cetobutirato derivado de metionina (BEQUETTE; BACKWELL; CROMPTON, 1998). A interação entre os substratos é uma possível explicação de como a maior remoção de metionina afeta o metabolismo hepático da leucina com uso de HMBi.

Plank (2011) testou diferentes fontes de metionina suplementar em dietas com 15,3% de proteína bruta. Os suplementos comparados a uma dieta controle foram DL-Metionina, Metionina rúmen protegida (SMA), HMB, HMBi, e uma fonte de metionina experimental com proteção ruminal (ERPM). Os tratamentos suplementares forneceram 18g/vaca/dia de quantidade equimolar de metionina. Não foram verificadas diferenças na produção de leite entre os tratamentos, com produções variando entre 29,2 e 31,3 kg de leite/dia. Quanto à composição do leite, observou-se redução no teor de gordura do leite no tratamento DL-Metionina (3,27 %) comparado à metionina protegida (3,57 %). O teor de proteína no leite promovido pelo Smartamine (3,30 %) foi maior que o do controle (3,20%), sem diferenças estatísticas entre os demais tratamentos. Os animais no tratamento com HMBi reduziram o consumo de matéria seca comparado aos tratamentos controle, DL-metionina e SMA, e tendeu a ser menor que HMB ($P=0.14$) e ERPM ($P=0.12$). Além do efeito do HMBi, nenhuma diferença no consumo de matéria seca foi observada entre os demais tratamentos.

Xia et al. (2012) avaliaram os efeitos do HMBi fornecido antes e após o parto comparado ao fornecimento somente no pós-parto. Os três tratamentos dietéticos avaliados foram: controle (dieta basal sem HMBi), T1- HMBi (0 g pré-parto e 18 g pós-parto), e T2- HMBi (10 g pré-parto e 18g pós-parto). Os tratamentos foram iniciados 21 dias antes da data prevista de parto e continuaram até 91 dias de lactação. A dieta basal apresentava relação lisina:metionina de 3,27:1 e 3,24:1 no pré e pós-parto, respectivamente. Os

tratamentos não afetaram o consumo de matéria seca, pico de produção de leite, dias de lactação para atingir pico de produção e o teor de proteína do leite. Os parâmetros sanguíneos ácidos graxos não esterificados, nitrogênio ureico, glutamato piruvato transaminase, glutamato oxalacetato transaminase também não foram afetados. Ambas as formas de suplementação de HMBi aumentaram a produção de leite, quantidade de sólidos (gordura, proteína e lactose) e o teor de gordura em comparação com o controle, sem diferenças entre as duas formas de suplementação. De forma geral, verificaram-se ganhos com a utilização de HMBi independentemente se o fornecimento foi iniciado no pré-parto ou somente no pós - parto para animais com produção de leite entre 26,57 e 29,75 kg/dia. Entretanto, a suplementação de análogo de metionina iniciada antes do parto apresentou tendência de reduzir nitrogênio ureico no leite em 0,6 mg/dL em relação ao controle ($P=0.07$) e reduziu significativamente o teor plasmático de β -hidroxi-butarato.

Phipps et al. (2008) avaliaram os efeitos da inclusão de HMBi (1,26g/kg MS MetaSmart, Adisseo, França) em dietas com baixo teor de PB (14,7%) ou PB considerada padrão (16,9%). Não houve efeito do teor de proteína dietética e da suplementação com HMBi no CMS (24,7 kg/dia). A suplementação com HMBi aumentou a concentração de proteína do leite em ambos os teores dietéticos de PB. Entretanto, observou-se interação significativa entre os fatores para produção de leite e leite corrigido para 3,5% de gordura (LCG 3,5%). Na dieta com menor teor de proteína bruta o uso de HMBi diminuiu a produção de leite (-2,0/dia) e tendeu a reduzir a LCG 3,5% (-2,1 kg/dia), e não afetou essas variáveis na dieta com PB padrão. E como resultado, a quantidade de proteína produzida aumentou com uso de HMBi na dieta com PB padrão, não sendo afetada na dieta com menor teor proteico. A interação entre o teor de proteína dietética e inclusão de HMBi, com diminuição na produção de leite, sem ganhos em sólidos, sugere que outros fatores limitaram a resposta à HMBi quando a

oferta de PB dietética foi restringida para vacas com produção de leite próxima a 38 kg/dia.

Mullins et al. (2013) objetivaram balancear uma dieta atendendo aos níveis e à relação lisina:metionina adequados, conforme os modelos do *National Research Council* (NRC, 2001) e do *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* versões 5.0 e 6.0, em comparação a uma dieta controle (com alta concentração de glúten de milho úmido) presumivelmente deficiente em lisina e com baixa relação metionina:lisina. A dieta controle foi ajustada com 190g/vaca/dia de sal de cálcio de ácidos graxos (*Megalac-R, Arm & Hammer Animal Nutrition*) que foi incorporado com lisina (*Megamine-L*), e a adição de 14 g/vaca/dia de HMBi (*MetaSmart*) de forma a atender à proteína metabolizável nos modelos nutricionais. A dieta com adição de lisina e metionina não afetou o CMS (26,6 kg/dia), produção de leite (40,1 kg/dia), teor de gordura (3,10 %) e proteína do leite (3,06 %). Os resultados verificados não suportam a hipótese de que o aumento no fornecimento de lisina e metionina aumentaria a produção de proteína do leite de vacas alimentadas com dieta à base de um subproduto de milho, indicando que outros aminoácidos poderiam ser limitantes ou, ainda, pode indicar falhas na predição dos modelos.

2.5 isopropanol

Álcoois e agentes lipofílicos interagem com a bicamada de lípidos nas células (SHEETZ; SINGER, 1974) e tem sido demonstrado que afetam diretamente a fluidez da membrana (HUI; BARTON, 1973). Alterações na fluidez da membrana podem afetar a energia de ativação de enzimas associadas à membrana (McMURCHIE; RAISON, 1979) que, por sua vez, pode afetar a cinética de transporte de metabólitos (tais como metionina) que entram na célula.

O aumento da fluidez da membrana celular é, também, associado com perda de conteúdo celular e morte celular em bactérias (EZEJI et al., 2010). Concentrações muito pequenas de metanol (1-2 %) têm sido utilizadas para separar bactérias de partículas de alimentos (TRABALZA-MARINUCCI et al., 2006). Como o HMBi é clivado para HMB e isopropanol, é possível que a hidrólise do isopropanol afete as membranas bacterianas de forma semelhante (PLANK, 2011).

No tratamento anaeróbico de esgoto, dois gêneros são conhecidos por utilizar acetato para realizar a metanogênese: *Methanosarcina* e *Methanosaeta* (JETTEN; STAMS; ZEHNDER, 1992; ZINDER, 1993). Ince et al. (2011) investigaram o efeito do isopropanol no nível de expressão da enzima acetil-CoA sintetase de *Methanosaeta concilii*, na produção de metano e na atividade dos microrganismos anaeróbicos. Neste estudo foi avaliado o efeito inibitório do isopropanol no grupo de microrganismos chave de metanogênese acetoclástica em biorreatores anaeróbios. Em lodos anaeróbios acondicionados em frascos plásticos, adicionaram-se acetato e isopropanol e foi realizada a quantificação de reação de cadeia de polimerase (PCR) em tempo real, para determinação do efeito do isopropanol, no nível de expressão da enzima-chave na produção de metano acetoclástica, a acetil-CoA sintetase. Além de PCR, a atividade de células de *Methanosaeta spp.*, também, foram quantificados usando hibridização fluorescente “in situ” (FISH). A abundância de transcrição acetil-CoA-sintetase foi $1,23 \pm 0,62 \times 10^6$ mRNAs/mL nos reatores sem isopropanol e resultou em uma produção acumulada de metano de 222 mL por frasco. A exposição ao isopropanol resultou em diminuições de 71,2 %, 84,7 %, 89,2 % e 94,6 % no nível de mRNA e de redução na produção de metano em 35 %, 65 %, 91,5 % e 100 % nas concentrações de isopropanol de 0,1; 0,5; 1,0 e 2,0 M, respectivamente. Exposições repetidas resultaram em altas inibições e no teste final a intensidades fluorescentes das células ativas de *Methanosaeta* foram

significativamente diminuídas em razão do isopropanol. Os resultados indicaram que o isopropanol apresentou efeito inibitório sobre a metanogênese acetoclástica, sem afetar a atividades das células de bactérias e de *Archaea*.

2.6 Outros aminoácidos limitantes

Lee et al. (2012a) conduziram dois experimentos contínuos com objetivo de investigar os efeitos da suplementação dietética de lisina e metionina rúmen-protégidas variando a proteína metabolizável (PM). No primeiro experimento, comparou-se uma dieta com quantidade adequada de PM (APM), com outra deficiente em PM suplementada com lisina (DPML); e com a dieta DPML mais metionina. As dietas com deficiência na PM e suplementadas com lisina e lisina+metionina rúmen-protégidas não diminuíram, estatisticamente, a produção de leite em comparação à dieta com adequada PM. No entanto, sem a suplementação com metionina, o teor de proteína do leite foi, significativamente, diminuído na dieta DMPL. Ambas as dietas deficientes em PM reduziram a quantidade diária de proteína em comparação com a dieta com adequada PM. A menor quantidade de proteína degradável no rúmen nas duas dietas com deficiência na PM deprimiu a digestibilidade de nutrientes no trato total e tenderam a diminuir, à excreção urinária de derivados purínicos, indicando fermentação ruminal prejudicada. Ao avaliar as concentrações de aminoácidos no plasma, verificou-se redução de treonina, valina, histidina e glutamina nas duas dietas com deficiência em PM comparada à dieta com adequada PM. Não foram verificadas diferenças em lisina, metionina e outros aminoácidos não essenciais, sugerindo que outros aminoácidos poderiam estar sendo limitantes. No segundo experimento foram testados dois tratamentos dietéticos: dieta com adequada PM suplementada com lisina rúmen-protégida (APML) ou a dieta APML suplementada com metionina rúmen-protégida (APMLM). A dieta

suplementada com lisina + metionina resultou em menor produção de leite que a dieta suplementada apenas com lisina (41,3 kg/d *versus* 42,0 kg/dia, $P=0,02$), fato relacionado à redução numérica de 0,9 kg no consumo de matéria seca ($P=0,40$) no tratamento APMLM.

Tomando como base as concentrações de aminoácidos no plasma, verificadas no experimento anterior, que indicaram a histidina como potencial aminoácido limitante, Lee et al. (2012b) avaliaram o efeito da suplementação de lisina, metionina e histidina rúmen protegidas. Foram comparadas quatro dietas: controle com adequada PM (ADPM); deficiente em PM (DPM), deficiente em PM e suplementada com lisina+metionina (DPMLM) e a dieta DPMLM suplementada com histidina (DMPLMH). A dieta com adequada proteína metabolizável apresentava 15,7% de PB e as dietas PM deficiente entre 13,5 e 13,6%. Na dieta com proteína metabolizável adequada (ADPM), verificou-se aumento nas digestibilidades aparentes da matéria seca, matéria orgânica, FDN, FDA e proteína bruta comparada com as outras três dietas com PM deficiente. A produção de leite foi reduzida na dieta DMP (35,2 kg/dia), mas foi semelhante entre a dieta ADMP (38,8 kg/dia) e as dietas DPMLM e DPMLH (36,9 e 38,5 kg/dia, respectivamente), em paralelo com os consumos de matéria seca. Segundo os autores, o aumento no consumo de matéria seca nas dietas com deficiência na PM (DPMLM e DPMLMH), em relação à dieta com deficiência em PM (DPM), desencadeou as respostas em leite e em produção de proteína de leite, particularmente, evidentes com a suplementação de lisina, metionina e histidina. E, uma vez que foi verificada redução nas digestibilidades, mas com tendência de aumento do consumo de matéria seca com a suplementação dos três aminoácidos rúmen-protégidos, os autores propuseram que, semelhante às espécies de monogástricos, os aminoácidos desempenham papel importante na regulação do consumo de matéria seca em vacas leiteiras. Os resultados apontam a histidina como aminoácido limitante em vacas leiteiras de alta produção

alimentadas com dietas à base de silagem de milho e alfafa pré-secada em com deficiência na proteína metabolizável.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. et al. Efeitos da suplementação de metionina análoga sobre a produção e composição do leite de vacas leiteiras de alta produção. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 47., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010. p. 3.

ARGYLE, J. L.; BALDWIN, R. L. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 8, p. 2017-2027, Aug. 1989.

ASSOUMANI, M. B. et al. Refinement of an enzymatic method for estimating the theoretical degradability of proteins in feedstuffs for ruminants. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 39, n. 4, p. 357-368, Nov. 1992.

ATASOGLU, C. et al. De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B₁₄, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 8, p. 2836-2843, Aug. 1998.

ATASOGLU, C.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Incorporation of [15N]Ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2819-2822, June 2001.

BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D. Nitrogen metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. E9-E21, 2005. Supplement.

BAKER, D. H. Utilization of precursors for L-amino acids. In: Mello, J. P. F. d' (Ed.). **Amino acids in farm animal nutrition**. Wallingford: CAB International, 1994. p. 37-64.

BELASCO, I. J. Fate of carbon-14 labeled methionine hydroxy analog and methionine in the lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 5, p. 775-784, May 1980.

BELASCO, I. J. Stability of methionine hydroxy analog in rumen fluid and its conversion *in vitro* to methionine by calf liver and kidney. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 3, p. 353-357, Mar. 1972.

BEQUETTE, B. J.; BACKWELL, F. R. C.; CROMPTON, L. A. Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 9, p. 2540-2559, Sept. 1998.

BERTHIAUME, R. et al. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 5, p. 1621-1634, May 2006.

BERTHIAUME, R. et al. Intestinal disappearance and mesenteric and portal appearance of amino acids in dairy cows fed ruminally protected methionine. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 194-203, Jan. 2001.

BLACK, A. L. et al. Glucogenic pathway for acetone metabolism in the lactating cow. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 222, p. 1575-1580, June 1972.

BREVES, G. et al. *Short communication*: transport of 2-hydroxy-4-methyl-thio-butanoic acid isopropyl ester by rumen epithelium *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 260-264, Jan. 2010.

BROCK, F. M. et al. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 3, p. 561-569, Sept. 1982.

BRODERICK, G. A.; WALLACE, R. J. Effects of dietary nitrogen source on concentrations of ammonia, free amino acids, and fluorescamine-reactive peptides in the sheep rumen. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, n. 9, p. 2233-2238, Sept. 1988.

BRUSS, M. L.; LOPEZ, M. J. Mixed ruminal microbes of cattle produce isopropanol in the presence of acetone but not 3-D-hydroxybutyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 11, p. 2580-2584, Nov. 2000.

BURGOS, S. A.; DAI, M.; CANT, J. P. Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 153-161, Jan. 2010.

CARDOZO, P. et al. Effect of pH on microbial fermentation and nutrient flow in a dual flow continuous culture system. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 265, July 2000. Supplement.

CHANDLER, P. T. et al. Protein and methionine hydroxy analog for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 59, n. 11, p. 1897-1909, Nov. 1976.

DALBACH, K. F. et al. Effects of supplementation with 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid isopropyl ester on splanchnic amino acid metabolism and essential amino acid mobilization in postpartum transition Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 8, p. 3913-3927, Aug. 2011.

DEPARTMENT OF COMMERCE USA. **A method for supplying bioavailable methionine to a cow**: WO 2000028835 A1. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/WO2000028835A1?cl=en>>. Acesso em: 10 mar. 2013.

DIBNER, J. J.; KNIGHT, C. D. Conversion of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid to L-methionine in the chick: a stereospecific pathway. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 144, p. 1716-1723, Mar. 1984.

DOEPEL, L. et al. Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1279-1297, May 2004.

EUROPEAN COMMISSION. **Health and consumer protection directorate-general**: report of the scientific committee on animal nutrition on the use of a HMBi: isopropyl ester of the hydroxylated analogue of methionine. Geneva, 2003. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scan/out129_en.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2013.

EZEJI, T. et al. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 85, n. 6, p. 1697-1712, Feb. 2010.

FALCONER, M. L.; WALLACE, R. J. Variation in proteinase activities in the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 84, n. 3, p. 377-382, 1998.

FELICE, M. de et al. Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli*. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 43, n. 1, p. 42-58, Mar. 1979.

FENG, Y. et al. Effects of 2-hydroxy-4(methylthio) butanoic acid isopropyl ester on rumen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 42, n. 5, p. 342-346, jan. 2013.

FIRKINS, J. L.; YU, Z.; MORRISON, M. Ruminant nitrogen metabolism: perspectives for integration of microbiology and nutrition for dairy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. E1-E16, June 2007. Supplement.

FOWLER, C. M. et al. Evaluation of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester (HMBi) and methionine (Met) supplementation on digestibility and efficiency of bacterial growth in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 576, 2010. Supplement.

FOX, D. G. et al. The Cornell net carbohydrate and protein system model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 112, n. 1, p. 29-78, 2004.

GIL, L. A. et al. Effect of methionine hydroxy analog on bacterial protein synthesis from urea and glucose, starch or cellulose by rumen microbes, *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 37, n. 1, p. 159-163, Jan. 1973.

GRAHAM, C.; SIMMONS, N. L. Functional organization of the bovine rumen epithelium. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 288, n. 1, p. R173-R181, Jan. 2005.

GRAULET, B.; RICHARD, C.; ROBERT, J. C. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxyl analog isopropyl ester. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 10, p. 3640-3649, Oct. 2005.

GRECO, L. F. **Suplementação de vacas HPB e vacas ½ HPB ½ Jersey mantidas em pastagem tropical com o éster isopropílico do análogo de metionina (HMBi)**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2008.

GRIEL, L. C. Milk production response to feeding methionine hydroxy analog to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 51, n. 11, p. 1866-1868, Nov. 1968.

HANIGAN, M. D. et al. Metabolic models of ruminant metabolism: recent improvements and current status. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. E52-E54, 2006. Supplement.

HINO, T.; RUSSELL, J. B. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 64, n. 1, p. 261-270, Jan. 1987.

HOOVER, W. H.; STOKES, S. R. Balancing carbohydrate and protein for optimum rumen microbial yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3630-3644, Oct. 1991.

HUBER, J. T. et al. Influences of methionine hydroxy analog on milk and milk fat production, blood serum lipids, and plasma amino acids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 2525-2531, Nov. 1984.

HUI, F. K.; BARTON, P. G. Mesomorphic behavior of some phospholipids with aliphatic alcohols and other nonionic substances. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 296, n. 3, p. 510-517, Mar. 1973.

INCE, B. et al. Inhibition effect of isopropanol on acetyl-CoA synthetase expression level of acetoclastic methanogen, *Methanosaeta concilii*. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 95-99, Nov. 2011.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE. **Ruminant nutrition**: recommended allowances and feed tables. Paris, 1989. 389 p.

JETTEN, M. S. M.; STAMS, A. J. M.; ZEHNDER, A. J. B. Methanogenesis from acetate: a comparison of the acetate metabolism in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina spp.* **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 88, n. 3/4, p. 181-197, June 1992.

JONES, B. A. et al. Degradation of methionine hydroxyl analog in the rumen of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 2, p. 525-529, Feb. 1988.

KAJIKAWA, H. et al. *Short Communication*: amino acids antagonistic to the amino acids inhibitory for growth rate of mixed ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2601-2603, July 2005.

KAJIKAWA, H.; MITSUMORI, M.; OHMOMO, S. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 8, p. 2015-2022, Aug. 2002.

KANNO, C. Secretory membranes of the lactating mammary gland. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 159, n. 2/3, p. 184-208, Aug. 1990.

KESSEL, J. S. van; RUSSELL, J. B. The effect of amino nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 7, p. 1237-1243, July 1996.

KIRAT, D. et al. Monocarboxylate transporter 1 (MCT1) plays a direct role in short chain fatty acids absorption in caprine rumen. **Journal of Physiology**, Bethesda, v. 576, n. 2, p. 635-647, Oct. 2006.

KOENIG, K. M. et al. Ruminal escape, gastrointestinal absorption, and response of serum methionine to supplementation of liquid methionine hydroxy analog in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 2, p. 355-361, Feb. 1999.

LAPIERRE, H. et al. Metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate (HMTBA) in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 3, p. 1526-1535, Mar. 2011.

LAPIERRE, H. et al. Triennial lactation symposium: mammary metabolism of amino acids in dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 5, p. 1708-1721, May 2012.

LAPIERRE, H. et al. What is the true supply of amino acids for a dairy cow? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, p. E1-E14, 2006. Supplement.

LAPIERRE, H.; LOBLEY, G. E. Nitrogen recycling in the ruminant: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, p. E223-E236, June 2001. Supplement.

LEE, C. et al. Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 9, p. 5253-5268, Sept. 2012a.

LEE, C. et al. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 10, p. 6042-6056, Oct. 2012b.

LOBLEY, G. E.; CONNELL, A.; REVELL, D. The importance of transmethylation reactions to methionine metabolism in sheep: effects of supplementation with creatine and choline. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 75, n. 1, p. 47-56, Jan. 1996.

LOBLEY, G. E. et al. Absorption of 2-hydroxy-4-methylthiobutyrate and conversion to methionine in lambs. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 3, p. 1072-1080, Mar. 2006.

LOOSLI, J. K. et al. Synthesis of amino acids in the rumen. **Science**, New York, v. 110, n. 2849, p. 110-144, Aug. 1949.

LUNDQUIST, R. G.; OTTERBY, D. E.; LINN, J. G. Influence of three concentrations of dl-methionine or methionine hydroxy analog on milk yield and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3350-3354, Dec. 1985.

MARTÍN-VENEGAS, R.; GERAERT, P. A.; FERRER, R. Conversion of the methionine hydroxy analogue dl-2-hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. **Poultry Science**, Champaign, v. 85, n. 11, p. 1932-1938, Nov. 2006.

McCOLLUM, M. Q. et al. Absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid by isolated sheep ruminal and omasal epithelia. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 4, p. 1078-1083, Apr. 2000.

McMURCHIE, E. J.; RAISON, J. K. Membrane lipid fluidity and its effect on the activation energy of membrane-associated enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 554, n. 2, p. 364-374, July 1979.

MULLINS, C. R. et al. *Short communication*: supplementing lysine and methionine in a lactation diet containing a high concentration of wet corn gluten feed did not alter milk protein yield. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 8, p. 5300-5305, Aug. 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy, 2001. 381 p.

NOBARI, B. B. et al. Effects of of 2-hydroxy 4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester (HMBi) and dl-Met on *in vitro* fermentation characters of high yielding dairy cow diets. **Annals of Biological Research**, Hefei, v. 4, n. 1, p. 213-218, 2013.

NOFTSGER, S. et al. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 1, p. 223-237, Jan. 2005.

NOFTSGER, S. et al. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) on microbial growth in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p. 2629-2636, Aug. 2003.

ORDWAY, R. S. et al. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 5154-5166, Oct. 2009.

Or-RASHID, M. M. et al. Biosynthesis of methionine from homocysteine, cystathionine, and homoserine plus cysteine by mixed rumen microorganisms *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 758-764, May 2001.

PACHECO, D. et al. Ability of commercially available dairy ration programs to predict duodenal flows of protein and essential amino acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 2, p. 937-963, Feb. 2012.

PATTERSON, J. A.; KUNG JUNIOR, L. Metabolism of dl-methionine and methionine analogs by rumen microorganisms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 12, p. 3292-3301, Dec. 1988.

PATTON, R. A. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 2105-2118, May 2010.

PHIPPS, R. H. et al. Short communication: effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester on milk production and composition of lactating Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 4002-4005, Oct. 2008.

PLANK, J. E. **Methionine and methionine analog supplementation:** comparison of bioavailability in dairy cows and differential utilization by rumen microbes in batch culture. 2011. 117 p. Master Thesis (Master of Science) - Ohio State University, Columbus, 2011.

POLAN, C. E.; CHANDLER, P. T.; MILLER, C. N. Methionine hydroxy analog: varying levels for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 53, n. 5, p. 607-610, May 1970.

PROUD, C. G. Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. **Biochemical Journal**, London, v. 403, n. 2, p. 217-234, Apr. 2007.

RAVANEL, S. et al. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 95, n. 13, p. 7805-7812, June 1998.

REYNOLDS, C. K. Splanchnic metabolism of amino acids in ruminants. In: Sejrsen, K.; Hvelplund, T.; Nielsen, M. O. (Ed.). **Ruminant physiology:** digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress. Wageningen: Academic, 2006. p. 225-248.

ROBERT, J. C. et al. Influence of 2-hydroxy-4 (methyl thio) butanoic acid isopropyl ester (HMBi) on the digestibility of organic matter and energy value of corn silage measured *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 240, 2002a. Supplement.

ROBERT, J. C. et al. Influence of length and ramification of the alcohol radical of esters of methionine and of 2-hydroxy-4(methylthio) butanoic acid on methionine bioavailability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 34, 2001a. Supplement.

ROBERT, J. C. et al. Investigation of the site of absorption and metabolism of a novel source of metabolisable methionine: 2-hydroxy-4(methylthio) butanoic acid isopropyl ester (HMBi). **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 35, 2001b. Supplement.

ROBERT, J. C. et al. Quantifying the metabolisable methionine contribution of a liquid or powder presentation of 2-hydroxy-4(methyl thio) butanoic acid isopropyl ester (HMBi). **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 1, p. 71, 2002b. Supplement.

ROBERT, J. C.; RICHARD, C.; BOUZA, B. Influence of monomer or dimer forms of isopropyl ester of HMB on the supply of metabolizable methionine to the blood of ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 281, 2001. Supplement.

ROBINSON, P. H. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: a systematic review of the literature. **Livestock Science**, New York, v. 127, n. 2/3, p. 115-126, Feb. 2010.

RULQUIN, H. et al. Effect of different forms of methionine on lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 4387-4394, Nov. 2006.

RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed ruminal bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 70, n. 5, p. 970-976, May 1987.

SAINT-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 7, p. 2487-2497, July 2005.

SCHWAB, C. G. Balancing diets for amino acids: nutritional, environmental and financial implications. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference, 1., 2010, Fort Wayne. **Proceedings...** Columbus: The Ohio State University, 2010. p. 1-13.

SCHWAB, C. G. et al. Amino acid limitation and flow to the duodenum at four stages of lactation: 1., sequence of lysine and methionine limitation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 12, p. 3486-3502, Dec. 1992.

SCHWAB, C. G. et al. Use of milk protein concentrations to estimate the "methionine bioavailability" of two forms of 2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid (HMB) for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 146, 2001. Supplement.

SHEETZ, M. P.; SINGER, S. J. Biological membranes as bilayer couples: a molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 71, n. 11, p. 4457-4461, Nov. 1974.

STIPANUK, M. H. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 24, p. 539-577, 2004.

STOKES, M. R.; CLARK, J. H.; STEINMETZ, L. M. Performance of lactating dairy cows fed methionine or methionine analog at two concentrations of dietary crude protein. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 8, p. 686-1694, Aug. 1981.

TRABALZA-MARINUCCI, M. et al. Evaluation of techniques to detach particle-associated microorganisms from rumen contents. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 125, n. 1, p. 1-16, Jan. 2006.

VAZQUEZ-ANON, M. et al. Effects of aliment on nutrient digestibility, bacterial protein synthesis, and ruminal disappearance during continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 1, p. 159-166, Jan. 2001.

VIRTANEN, A. I. Milk production of cows on protein-free feed. **Science**, New York, v. 153, p. 1603-1614, 1966.

VLAEMINCK, B. et al. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 131, p. 389-417, Dec. 2006.

WALKER, N. D.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. Nitrogen metabolism in the rumen. In: Pfeffer, E.; Hristov, A. (Ed.). **Nitrogen and phosphorus nutrition of cattle**. Wallingford: CABI, 2005. p. 71-115.

WALLACE, R. J.; McKAIN, N. A survey of peptidase activity in rumen bacteria. **Journal of General Microbiology**, London, v. 137, n. 5, p. 2259-2264, May 1991.

WILLIAMS, V. J.; MOIR, R. J. Ruminal flora studies in the sheep: III., the influence of different sources of nitrogen upon nitrogen retention and upon the total number of free microorganisms in the rumen. **Australian Journal of Science Research Serie B**, Victoria, v. 4, p. 377-381, 1951.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, Wien, v. 37, n. 1, p. 1-17, May 2009.

XIA, K. et al. Effects of feeding methylthio butyric acid isopropyl ester on postpartum performance and metabolism in dairy cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 25, n. 5, p. 659-664, May 2012.

ZINDER, S. Physiological ecology of methanogens. In: Ferry, J. G. (Ed.). **Methanogenesis**. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 128-206.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 Resposta de vacas leiteiras à substituição de soja crua por
soja tostada**

Nilson Nunes Morais Júnior^{*}

Artigo normalizado de acordo com a NBR 6022 (ABNT, 2003).

^{*} Mestre em Zootecnia/UFLA; nilson.morais@ifes.edu.br

RESUMO

Em dois experimentos realizados em delineamento de reversão simples de tratamentos, o desempenho produtivo de vacas Holandês, recebendo silagem de milho como forragem única na dieta, foi utilizado como ensaio biológico para avaliar o tratamento térmico da Alfa Nutrisoja (Cooperalfa, Chapecó, SC), uma soja integral tostada. No experimento 1, foram utilizadas 22 vacas alimentadas com 3,7% de soja integral crua ou tostada na matéria seca (MS) da dieta. A soja tostada em substituição à crua aumentou a produção de leite de 30,8 para 31,9 kg/dia ($P=0,03$), as secreções de sólidos totais ($P=0,04$) e lactose ($P=0,01$), sem efeito no nitrogênio ureico no leite (NUL) e o consumo de matéria seca (CMS). No experimento 2, dezesseis vacas testaram a substituição das fontes de soja em 11% na MS dietética. A dieta com soja tostada promoveu incrementos na produção de leite (+1,1 kg/dia, $P=0,05$) e lactose (+0,06 kg/dia, $P=0,03$) com redução na concentração de glicose plasmática (-3,4 mg/dL, $P=0,01$). Não houve efeito da tostagem nas digestibilidades da matéria seca, matéria orgânica e da fibra em detergente neutro, bem como no padrão ingestivo dos animais ($P>0,05$). O teor de NUL leite, também, não foi afetado, sendo observada tendência ($P=0,08$) de redução na relação alantoína/creatinina na urina com uso da soja processada termicamente. No ensaio *in situ* de degradabilidade da proteína das fontes de soja foi verificada redução da fração A da proteína total ($P<0,01$) e aumento da fração B ($P<0,01$) em virtude da tostagem, sem diferença significativa ($P = 0,63$) na fração indigestível. A substituição de soja crua por soja tostada nos dois níveis de inclusão dietéticos testados aumentou de produção de leite sem afetar o consumo e a composição do leite, demonstrando que tratamento térmico foi efetivo na indução de aumento no fluxo de aminoácidos metabolizáveis de soja para o animal.

Palavras-chave: Soja integral. Soja tostada. Proteína não-degradável no rúmen.

1 INTRODUÇÃO

A soja é a principal fonte de proteína verdadeira para vacas leiteiras no Brasil, majoritariamente na forma de farelo. Este fato, associado à proibição de uso de fontes proteicas de origem animal, limita a formulação de dietas ricas em proteína não degradável no rúmen.

A substituição de alimentos proteicos com alta degradabilidade ruminal da proteína por alimentos ricos em proteína não degradável no rúmen pode aumentar o fluxo de aminoácidos metabolizáveis para o animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001). O tratamento térmico da soja integral é uma alternativa para reduzir a degradabilidade ruminal de sua proteína (FALDET et al., 1991).

Mielke e Schingoethe (1981) observaram que a substituição do farelo de soja por soja integral crua não promoveu incremento na produção de leite, enquanto que sua substituição por soja integral tostada foi efetiva, demonstrando a importância da elevação do teor dietético de proteína não degradável no rúmen como estratégia nutricional na alimentação de vacas de alta produção. A soja integral tostada pode suprir aminoácidos dietéticos em forma não degradável no rúmen, potencialmente capazes de estimular a produção de vacas leiteiras (FALDET; SATTER, 1991; RUEGSEGGER; SCHULTZ, 1985). Entretanto, a eficiência da tostagem como forma de redução da degradabilidade ruminal da proteína no grão de soja depende do tempo e da temperatura de processamento (FALDET et al., 1991; TREMBLAY; BRODERICK; ABRAMS, 1996), uma possível explicação para a

ausência de resposta animal à substituição de soja crua por tostada em alguns experimentos (BERNARD, 1990; DLJK et al., 1983).

Objetivou-se neste trabalho avaliar a efetividade do tratamento térmico de tostagem do grão de soja Alfa Nutrisoja por meio de ensaio de degradabilidade ruminal, e a resposta em desempenho produtivo quando de sua inclusão em dietas de vacas leiteiras em substituição à soja crua.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1

Animais e delineamento experimental

Vinte e duas vacas da raça Holandês, dezoito multíparas e quatro primíparas, com 175 ± 60 dias em lactação, no início do experimento, foram blocadas em onze grupos de dois animais com base na ordem de parto e produção diária de leite. Dentro de cada bloco, os animais foram, aleatoriamente, alocados a uma sequência de dois tratamentos, em delineamento de reversão simples com dois períodos de 13 dias, sendo 10 dias de adaptação.

Instalações e manejo

A instalação utilizada foi confinamento do tipo “tie-stall” com cama de areia, sistema de nebulização e ventilação automática, com cortinas para proteção dos animais na eventual ocorrência de chuvas. A alimentação foi fornecida, individualmente, duas vezes ao dia, às 6 h e às 14 h, na forma de dieta completa, em quantidade suficiente para prover mínimo de 10% do oferecido como sobra diária. A proporção dos

ingredientes dietéticos na dieta completa foi mantida constante por monitoramento semanal do teor de matéria seca da silagem de milho em aparelho tipo Koster (Koster Moisture Tester, Strongsville, EUA). As vacas foram ordenhadas três vezes ao dia, às 4 h e 30 min, 12 h e 30 min e às 20 h, com a utilização de ordenhadeira mecânica em circuito fechado.

Dietas Experimentais

A soja crua e a soja tostada (Alfa Nutrisoja, Cooperalfa, Chapecó, SC), utilizadas neste experimento, foram originárias do mesmo lote, diferenciando apenas no tratamento térmico ao qual a soja tostada foi submetida. No processo de tostagem, partidas de dez toneladas foram aquecidas a vácuo por injeção de vapor, por dez a quinze minutos, sob temperatura de 125°C e pressão de 2 kgf/cm². Após o período de aquecimento, a autoclave foi aberta para saída do vapor e o vácuo foi induzido para a obtenção do teor de umidade no grão de 14 a 15%, a 70°C. Posteriormente, os grãos foram transferidos para uma coluna resfriadora, onde atingiram umidade de 12%, sendo, posteriormente, armazenados em sacos de 40 kg. A soja crua foi obtida do mesmo lote da tostada, sendo processada em um desintegrador de forragem sem peneiras (moagem grosseira) para obtenção de tamanho de partícula semelhante à da soja tostada. Os tratamentos foram: Soja Crua ou Soja Tostada com nível de inclusão de 3,7% na matéria seca da dieta (Tabela 1).

Tabela 1 Composição centesimal e química das dietas oferecidas e composição química das sobras e dietas consumidas (% da matéria seca). **Experimento 1**

	Soja Crua	Soja Tostada
Dieta oferecida		
Silagem de milho	47,7	47,7
Soja integral crua moída grosseiramente	3,7	-
Soja integral tostada moída grosseiramente	-	3,7
Milho maduro moído fino	16,0	16,0
Farelo de soja	16,9	16,9
Polpa de citros	12,3	12,3
HMBi ¹	0,12	0,12
Ureia	0,4	0,4
Óxido de magnésio	0,2	0,2
Bicarbonato de sódio	0,8	0,8
Sal branco	0,3	0,3
Calcário calcítico	1,3	1,3
Mínerais e Vitaminas ²	0,3	0,3
Proteína bruta (PB)	17,3	17,3
Fibra em detergente neutro (FDN)	35,5	35,6
Extrato etéreo (EE)	4,5	4,5
Cinzas	8,6	8,6
Carboidratos não fibrosos (CNF) ³	34,0	34,0
Sobras (média ± SD, n=22)		
PB	15,7 ± 1,7	14,9 ± 1,7
FDN	39,0 ± 3,9	40,2 ± 4,8
EE	2,3 ± 0,7	2,8 ± 1,0
Cinzas	9,1 ± 1,3	9,3 ± 1,9
CNF ³	34,0 ± 5,0	32,8 ± 4,7
Dieta consumida		
Proteína bruta (PB)	17,6	17,7
Fibra em detergente neutro (FDN)	35,0	34,9
Extrato etéreo (EE)	4,9	4,8
Cinzas	8,5	8,5
CNF ³	34,0	34,1

¹Acido butanoico, 2-hidroxi-4-(metil-tio)-1-metil etil éster (Metasmart, Adisseo Inc., Antony, France). ²Mínerais e Vitaminas - Composição (por kg do produto): 200 g de Ca; 150 g de P; 30,0 g de S; 30,0 g de Mg; 100 mg de Co; 3.000 mg de Cu; 180 mg de I; 3.000 mg de Mn; 12000 mg Zn; 100.000 UI de vit A; 250.000 UI de vit D3; 6.250 UI de vit E. ³Carboidratos não fibrosos, CNF= 100 - (PB + FDN + EE + Cinzas).

Variáveis avaliadas

O consumo individual foi avaliado entre os dias 11 a 13 de cada período experimental por três dias consecutivos, sendo registradas as quantidades oferecidas e respectivas sobras das dietas. Durante o período de avaliação do consumo, foram coletadas amostras de todos os ingredientes da dieta, sendo as amostras de silagem congeladas (-20°C). As amostras individuais de sobras diárias de dieta, também, foram congeladas (-20°C) e, posteriormente, utilizadas para formar uma amostra composta de cada período para cada vaca. As amostras de silagem de milho e sobras individuais de dieta foram pré-secas em estufa de ventilação forçada regulada a 55°C, por 72 horas. Após a pré-secagem, todas as amostras coletadas foram trituradas em moinho de facas do tipo Thomas-Willey, dotado de peneira com malha de 1 mm. Sub amostras foram desidratadas a 100°C por 24 horas para determinação do teor de matéria seca. Todos os ingredientes dietéticos e sobras de dieta foram analisados em triplicata, sendo o teor de proteína bruta por destilador a vapor tipo Mikrokjeldhal (AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY - AOCS, 1989), o de extrato etéreo segundo a Association of Official Analytical Chemists - AOAC (1990), o teor de cinzas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas em mufla, e o teor de fibra em detergente neutro (FDN), analisado em determinador de fibra TE-149 (Tecnal, Piracicaba, SP), usando amilase e sulfito de sódio

As produções individuais diárias de leite e de sólidos mensuradas entre os dias 11 e 13 de cada período experimental foram utilizadas para comparar os tratamentos. Durante três dias, amostras de nove ordenhas

consecutivas foram obtidas para determinação dos teores de proteína, gordura, lactose e nitrogênio ureico. Para compor as amostras diárias de leite, coletaram-se em cada uma das três ordenhas alíquotas proporcionais à produção ($0,05\% \times \text{produção de leite/ordenha}$).

As amostras diárias de leite foram acondicionadas em frascos plásticos (capacidade de 60 mL) com conservante bronopol e encaminhadas ao Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) em Curitiba, Paraná, para determinação dos teores de gordura, proteína, lactose e sólidos totais no equipamento Bentley 2000 (Bentley Instruments[®]), por meio dos sistemas óptico e infravermelho. A análise da concentração de nitrogênio ureico do leite foi realizada em equipamento Chemspec 150 (Bentley Instruments[®]), utilizando-se a metodologia de Berthelot.

A secreção diária de energia no leite (EnLeite) foi calculada pela equação: $0,0929\% \text{ de gordura} + 0,0547\% \text{ de proteína} + 0,0395\% \text{ de lactose}$)* kg de leite (NRC, 2001). A produção de leite ajustada para energia (LeiteE) foi calculada pela equação: $\text{LeiteE} = \text{Enleite}/0,70$, considerando que o conteúdo de energia em um leite com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose é de 0,70 Mcal/kg.

Experimento 2

Animais e delineamento experimental

Dezesseis vacas da raça Holandês, doze multíparas e quatro primíparas, com 130 ± 50 dias em lactação, no início do período experimental, foram blocadas em oito grupos de dois animais com base na ordem de parto e produção diária de leite. Dentro de cada bloco, os

animais foram, aleatoriamente, alocados a uma sequência de dois tratamentos, em delineamento de reversão simples com dois períodos experimentais de 21 dias, sendo destinados 14 dias para adaptação das vacas aos tratamentos.

Instalações e manejo

As instalações foram as mesmas do experimento 1. Os ingredientes dietéticos foram pesados e misturados duas vezes ao dia e oferecidos às 7 h e 15 h, em quantidade suficiente para prover, no mínimo, 10% do oferecido como sobras diárias. Foi mantida a proporção dos ingredientes na dieta por monitoramento semanal do teor de matéria seca da silagem de milho em aparelho tipo Koster (Koster Moisture Tester, Strongsville, EUA). As vacas foram ordenhadas três vezes por dia, nas mesmas condições e horários do experimento anterior.

Dietas experimentais

A soja crua e a soja tostada (Alfa Nutrisoja, Cooperalfa, Chapecó, SC) provenientes do mesmo lote foram obtidas e utilizadas de forma idêntica à descrita no experimento 1, com a diferença de que o nível de inclusão neste experimento foi superior, sendo de 11% na matéria seca das dietas (Tabela 2).

Tabela 2 Composição das dietas oferecidas em ingredientes e das dietas consumidas em nutrientes nos tratamentos Soja Crua e Soja Tostada. **Experimento 2.**

	Soja Crua	Soja Tostada
	% da matéria seca	
Silagem de milho	46,9	46,9
Soja integral crua	11,0	
Soja integral tostada		10,9
Farelo de soja	13,0	13,0
Polpa de citros	16,2	16,2
Milho maduro moído fino	10,7	10,7
Minerais e vitaminas ¹	1,0	1,0
Bicarbonato de sódio	1,3	1,3
Proteína bruta	15,9	16,3
Fibra em detergente neutro (FDN)	36,4	37,3
FDN oriundo de silagem de milho	26,6	26,4
Extrato etéreo	5,1	5,3
Cinzas	6,0	6,1
CNF ²	36,5	34,7
	% da matéria natural	
Matéria seca	44,0	44,0

¹Minerais e Vitaminas: 18,5% de Ca; 15% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240 ppm de Co; 3.000 ppm de Cu; 8.000 ppm de Mn; 12.000 ppm de Zn; 90 ppm de Se; 180 ppm de I; 1.000.000 UI/kg de Vit. A; 250.000 UI/kg de Vit. D; 6.250 UI/kg de Vit E.

²Carboidratos não fibrosos, CNF = 100 - (PB + FDN + EE + Cinzas).

Variáveis avaliadas

O consumo individual foi avaliado por cinco dias consecutivos (dias 16 a 20 de cada período experimental), sendo registradas as quantidades oferecidas e respectivas sobras individuais diárias de dietas. A avaliação de consumo e as análises bromatológicas foram realizadas utilizando os mesmos procedimentos do experimento 1.

A produção de leite foi mensurada durante três dias consecutivos (dias 16 a 20 de cada período experimental). Amostras de seis ordenhas

consecutivas coletadas entre os dias 17 e 19 formaram duas amostras diárias de leite que foram utilizadas para determinação dos teores de sólidos e nitrogênio ureico (Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba, PR), conforme procedimentos descritos no experimento 1. A quantidade de energia excretada no leite e a produção de leite ajustada para energia (LeiteE) foram calculadas como descrito anteriormente.

As digestibilidades aparentes no trato digestivo total da matéria seca, da matéria orgânica, da FDN e da matéria orgânica não-FDN foram determinadas por mensuração da produção fecal por coleta total realizada em três etapas de oito horas ininterruptas de coleta realizadas entre os dias 18 a 20 de cada período experimental. As coletas de fezes em cada uma das etapas foram iniciadas em cada dia com oito horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter uma amostra representativa das 24 horas do dia. Os compostos fecais foram desidratados em estufa de ventilação forçada (55°C; 72 h) e os teores de FDN e cinzas determinados conforme descritos no experimento 1.

O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado multiplicando o consumo de matéria orgânica mensurado entre os dias 16 a 20 pelo coeficiente de digestibilidade da matéria orgânica mensurada entre os dias 18 a 20. A eficiência de utilização energética foi calculada pela relação entre a secreção de energia no leite e o CMOD.

Seis amostras de urina de cada vaca foram obtidas concomitantemente à coleta de fezes, visando estimar a síntese relativa de proteína microbiana no rúmen. Ao volume de urina coletado foram imediatamente adicionados 2% de ácido sulfúrico a 20%, sendo as

amostras armazenadas a 4°C durante o período de coleta. No dia seguinte ao da coleta, as amostras compostas de urina de cada vaca foram diluídas com água destilada na proporção 1:4 (urina: água) e congeladas a -20°C até a realização das análises. A análise da concentração urinária de alantoína foi realizada, conforme procedimento descrito por Chen e Gomes (1995) e para determinação do teor de creatinina foi utilizado kit comercial (Labtest diagnostica S.A., Lagoa Santa, MG). A relação entre alantoína e creatinina urinária foi utilizada como estimativa do crescimento microbiano ruminal.

No dia 20 de cada período experimental foram coletadas amostras de sangue nos vasos coccígeos 12 horas após a alimentação matinal para avaliação da concentração plasmática de glicose. O sangue foi coletado em tubos vacuolizados, contendo fluoreto de potássio, sendo imediatamente centrifugado a 1000 x g por 15 minutos, e o plasma armazenado a -20°C até o momento da análise. A análise de glicose foi realizada com kit laboratorial (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Cat. 27).

No dia 21 foi avaliada a atividade mastigatória das vacas por observação visual da atividade bucal a cada cinco minutos por 24 horas. As atividades bucais consideradas foram: ingestão de alimento, ruminação e ócio. O tempo de mastigação em minutos por dia foi definido como a soma dos tempos de ingestão e de ruminação.

Visando descrever as unidades experimentais, no dia 21 de cada período experimental, foram avaliados o peso vivo e a condição de escore corporal, sendo esta atribuída em escala de 1 a 5 (WILDMAN et al.,

1982) por três avaliadores independentes e utilizado o escore médio de cada animal.

Ensaio de degradabilidade

A degradabilidade ruminal da proteína nos grãos de soja crua e tostada foi avaliada *in situ* em três vacas com cânula ruminal. Amostras pré-secadas de 5 g foram inseridas em sacos de poliéster de 9 x 11 cm e incubadas no rúmen em triplicata nos tempos 0, 3, 6, 9, 12, 24 e 72 horas. Considerando R a massa de proteína no resíduo após incubação e lavagem das amostras, e I a massa inicial na amostra, a fração A instantaneamente degradada foi: $A = (I - R \text{ do tempo } 0)/I$; a fração C indigestível foi: $C = R \text{ no tempo } 72/I$; e a fração B lentamente degrada foi: $B = 100 - (A + C)$. A taxa fracional de degradação da fração B (kd) foi estimada ao longo do tempo por regressão linear do logaritmo natural dos resíduos como porcentagem da amostra inicialmente incubada, após subtração da fração C destes valores.

Análise estatística

Os dados das variáveis avaliadas nos experimentos 1 e 2 foram analisados pelo procedimento GLM do Statistical Analysis System Institute - SAS Institute (2003) com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + V_{j(i)} + P_k + T_l + e_{ijkl}$$

Onde:

Y_{ijkl} = Variável dependente;

μ = Média geral;

B_i = Efeito de bloco (i = 1 a 11 exp. 1; i = 1 a 8 exp. 2);

$V_{j(i)}$ = Efeito de vaca dentro de bloco (j = 1 a 22 exp 1; j = 1 a 16);

P_k = Efeito de período ($k = 1$ ou 2);

T_l = Efeito de tratamento ($l =$ Dieta Soja Crua ou Dieta Soja Tostada);

e_{ijkl} = erro experimental, independente, com distribuição normal, média zero e variância σ^2 .

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve ($P > 0,05$) diferenças entre tratamentos nos consumos de matéria seca (Experimentos 1 e 2; Tabelas 3 e 4), de matéria orgânica e de matéria orgânica digestível (Experimento 2; Tabela 4). De forma similar Faldet e Satter (1991) não encontraram diferença no CMS ao comparar farelo de soja, soja crua ou soja tostada em dietas isonitrogenosas, fornecidas para vacas alimentadas com silagem de alfafa como volumoso exclusivo. Em experimento contínuo por 15 semanas Ruegsegger e Schultz (1985), também, não verificaram diferença no consumo de vacas leiteiras ao compararam concentrados com soja tostada ou farelo de soja em dietas baseadas em alfafa.

Tabela 3 Composição do leite e desempenho de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo soja crua ou soja tostada.

Experimento 1

	Soja Crua	Soja Tostada	EPM ¹	P Trat ²
	kg/vaca/dia			
Consumo de matéria seca	20,5	20,4	0,30	0,76
Leite	30,8	31,9	0,32	0,03
LeiteE ³	28,0	29,1	0,47	0,09
Gordura	0,944	0,985	0,0239	0,24
Proteína	0,962	0,985	0,0099	0,11
Lactose	1,423	1,483	0,0160	0,01
Sólidos	3,612	3,757	0,0459	0,04
	% no leite			
Gordura	3,07	3,13	0,059	0,55
Proteína	3,15	3,12	0,010	0,09
Lactose	4,62	4,67	0,016	0,06
Sólidos	11,79	11,88	0,059	0,30
	mg/dL			
N-ureico no leite	14,9	15,1	0,31	0,65
	Mcal/dia			
Energia no leite (Enleite) ⁴	19,6	20,4	0,30	0,09
	Mcal/kg			
Eficiência ⁵	1,51	1,58	0,025	0,07

¹EPM = Erro padrão da média. ²P Trat = Probabilidade para o efeito de tratamento.

³LeiteE = Leite ajustado para energia, LeiteE = Enleite/0,70, considerando que o conteúdo de energia de 0,70 Mcal/kg em um leite com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose. ⁴EnLeite= Secreção diária de energia no leite, calculada pela equação: 0,0929*% gordura + 0,0547*% de proteína + 0,0395*% de lactose)*kg de leite. ⁵Eficiência2 = Leite/Consumo de matéria seca.

Tabela 4 Desempenho produtivo, sólidos do leite, relação alantoína:creatinina na urina e concentração de glicose no plasma de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo Soja crua e Soja tostada. **Experimento 2**

	Soja crua	Soja Tostada	EPM ¹	P Trat ²
	kg/vaca/dia			
CMS ³	19,1	19,5	0,39	0,51
CMOD ⁴	13,3	13,2	0,31	0,80
Leite	29,1	30,2	0,40	0,05
LeiteE ⁵	27,3	28,4	0,52	0,18
Gordura	0,976	0,990	0,018	0,58
Proteína	0,887	0,912	0,014	0,22
Lactose	1,330	1,391	0,019	0,03
	% no leite			
Gordura	3,38	3,30	0,05	0,30
Proteína	3,06	3,04	0,02	0,33
Lactose	4,57	4,60	0,02	0,22
	mg/dL			
N-ureico no leite	11,9	11,9	0,28	0,84
	Mcal/dia			
Energia no leite (Enleite) ⁶	19,2	19,7	0,27	0,18
	Mcal/kg			
Eficiência ⁷	1,49	1,50	0,03	0,21
	Relação na urina			
Alantoína/Creatinina	2,2	1,6	0,24	0,08
	mg/dL			
Glicose plasmática	54,8	51,4	0,90	0,01
	Kg			
Peso vivo	612	609	2,3	0,29
	Escala 1 a 5			
ECC ⁸	3,1	3,2	0,03	0,17

¹EPM = Erro padrão da média. ²P Trat = Probabilidade para o efeito de tratamento ³CMS = Consumo de matéria seca. ⁴CMOD = Consumo de matéria orgânica digestível. ⁵LeiteE = Leite ajustado para energia (LeiteE = Enleite/0,70; considerando de 0,70 Mcal/kg o conteúdo de energia em um leite com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose). ⁶EnLeite = Secreção diária de energia no leite, calculada pela equação: 0,0929*% de gordura + 0,0547*% de proteína + 0,0395*% de lactose)*kg de leite. ⁷Eficiência1 = Energia no leite/CMOD. ⁸ECC = escore de condição corporal.

A substituição da soja integral crua por soja integral tostada, mesmo em baixa inclusão dietética (3,7% da matéria seca), promoveu resposta positiva e rápida no desempenho leiteiro (Tabela 3), sendo observados incrementos nas secreções diárias de leite (+1,1 kg/dia; $P = 0,03$), de sólidos (+0,145 kg/dia; $P = 0,04$), e, principalmente, de lactose (+0,060 kg/dia; $P = 0,01$). No experimento 2, a inclusão de 10,9% de soja tostada na matéria seca dietética, também, promoveu aumentos nas produções de leite ($P = 0,05$) e de lactose ($P = 0,03$) (Tabela 4). Com inclusão de 13% na matéria seca dietética, Faldet e Satter (1991) verificaram aumento de 4,5 kg/dia na produção de leite quando utilizaram soja tostada em comparação à soja crua. Ruegsegger e Schultz (1985) relataram incremento de 2,0 kg/dia de leite ao utilizar soja tostada em substituição ao farelo de soja no concentrado de vacas alimentadas com pré-secado e feno de alfafa como forragem. No entanto, em outros trabalhos não foram verificados efeitos da inclusão de soja tostada sobre a produção de leite (BERNARD, 1990; DLJK et al., 1983; MIELKE; SCHINGOETHE, 1981).

Um fator que pode justificar a inconsistência nos resultados entre os trabalhos encontrados na literatura é o processamento térmico ao qual o grão de soja foi submetido, com reflexo na disponibilidade de proteína no intestino delgado (FALDET; SON; SATTER, 1992). O tratamento térmico ótimo da soja visando aumentar a utilização por ruminantes deve apresentar PDI (*protein dispersibility index*) entre 9 e 11 % (HSU; SATTER, 1995), sendo este índice utilizado para classificar a qualidade da soja após o processo de aquecimento. A soja tostada, utilizada nos dois experimentos do presente trabalho, apresentou PDI de 10,5 e, portanto,

dentro da faixa adequada visando maximizar a utilização da proteína não degradável presente na soja.

As maiores produções de leite, observadas no tratamento com soja tostada nos dois experimentos estão relacionadas com as respectivas maiores produções de lactose (Tabelas 3 e 4). A lactose é o carboidrato que promove maior impacto positivo na produção de leite (Danfaer, 1994; Wheelock; ROOK, 1966), e o aumento na sua secreção em virtude da maior quantidade de aminoácidos disponível para o animal, também, tem sido observado. Doepel e Lapierre (2010) verificaram aumento na produção de lactose e, conseqüentemente, na produção de leite, quando vacas leiteiras receberam infusão no abomaso de uma mistura contendo aminoácidos em comparação àquelas que foram infundidas com água. De forma similar, a infusão de caseína no intestino delgado resultou em aumento do teor de lactose e da produção de leite em comparação àquelas que receberam tratamento controle (LEMOSQUET et al., 2009).

Uma possível explicação, para o aumento na produção de lactose nas vacas que receberam as dietas com soja tostada (Tabelas 3 e 4), refere-se ao incremento na disponibilidade de aminoácidos metabolizáveis oriundos da fração da proteína não degradável no rúmen (PNDR) da soja tostada. Estes aminoácidos seriam utilizados como substrato no ciclo de Krebs, fazendo com que a necessidade de glicose da célula fosse diminuída e direcionada para o complexo de golgi para a produção de lactose. Uma teoria alternativa é que os aminoácidos oriundos da soja tostada possam atuar diretamente no núcleo da célula para aumentar a expressão de receptores de glicose nas células da glândula mamaria. Este fato pode ser associado à redução ($P = 0,01$) da

concentração de glicose plasmática nas vacas que receberam a dieta com soja tostada (Tabela 4).

O incremento na produção de leite ($P = 0,03$), sem o simultâneo aumento no consumo diário de matéria seca ($P > 0,05$), promoveu tendência de melhoria na eficiência alimentar na dieta com soja tostada (Tabela 3). Não houve efeito da tostagem da soja no teor de nitrogênio ureico no leite (Tabelas 3 e 4), sugerindo que a variação na forma da soja integral não afetou, significativamente, a disponibilidade ruminal de nitrogênio e, provavelmente, a absorção de proteína metabolizável de origem microbiana. No entanto, ressaltou-se que houve tendência ($P = 0,08$) de redução na relação alantoína/creatinina no tratamento com soja tostada. Isto pode ser parcialmente atribuído à menor quantidade de proteína degradável disponível para os microrganismos no rúmen, consequência da tostagem do grão de soja. Diferença no fluxo de proteína metabolizável de origem endógena, também, foi pouco provável, já que o consumo diário de matéria seca foi similar entre tratamentos.

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre tratamentos quanto à digestibilidade da matéria seca, da matéria orgânica e da FDN (Tabela 5), bem como sobre as atividades de mastigação, ingestão e ruminação das vacas (Tabela 6). Como não foram verificadas diferenças nas digestibilidades, acrescenta-se um indicativo de que a quantidade de nitrogênio disponível no rúmen teve pequeno efeito no crescimento microbiano, já que, a maior disponibilidade de nitrogênio para os microrganismos no rúmen relaciona-se ao aumento de digestibilidade da matéria orgânica (HUHTANEN; RINNE; NOUSIAINEN, 2009).

Tabela 5 Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo Soja crua e Soja tostada. **Experimento 2**

	Soja crua	Soja Tostada	EPM ¹	P Trat ²
	%			
DMS ³	71,2	69,1	0,89	0,10
DMO ⁴	74,0	72,2	0,78	0,10
DFDN ⁵	53,7	53,0	1,73	0,78
DMOnFDN ⁶	86,6	84,7	0,65	0,05

¹EPM = Erro padrão da média. ³DMS = Digestibilidade da matéria seca. ⁴DMO = Digestibilidade da matéria orgânica. ⁵DFDN = Digestibilidade da FDN. ⁶DMOnFDN = Digestibilidade da matéria orgânica não-FDN

Tabela 6 Atividade mastigatória de vacas Holandês alimentadas com dietas contendo Soja crua e Soja tostada. **Experimento 2**

	Soja crua	Soja Tostada	EPM ¹	P Trat ²
	min/dia			
Ruminação	397	400	15,9	0,87
Ingestão	240	227	10,0	0,36
Mastigação ³	637	627	19,1	0,73
	min/kg de matéria seca consumida			
Ruminação	18,3	18,6	0,75	0,79
Ingestão	11,0	10,6	0,46	0,51
Mastigação ³	29,3	29,2	0,92	0,92

¹EPM=Erro padrão das médias. ²P Trat = Probabilidade para o efeito de tratamento. ³Mastigação=Ruminação + Ingestão

No ensaio de degradabilidade ruminal *in situ* verificou-se maior ($P = 0,01$) da porcentagem da fração instantaneamente degradável na soja integral crua comparada à soja submetida à tostagem. De forma oposta verificou-se aumento da fração B em razão do tratamento térmico ($P < 0,01$) com uma diminuição numérica na taxa de degradação (kd) da fração

B e não houve diferença significativa ($P = 0,63$) na fração C entre os tratamentos (Tabela 7), indicando que o processo de tostagem foi efetivo em reduzir a degradação ruminal da proteína sem aumentar a fração indigestível.

Tabela 7 Cinética de degradação ruminal da proteína bruta na soja integral crua e na soja tostada. **Ensaio de degradabilidade**

	Soja Crua	Soja Tostada	EPM ¹	P Trat ²
	% da PB			
Fração A ³	20,9	15,4	1,3	0,01
Fração B ⁴	74,8	81,0	1,0	0,01
Fração C ⁵	4,3	3,6	1,0	0,63
	%/hora			
kd de B ⁶	3,82	2,75	0,45	0,17

¹EPM = Erro padrão da média. ²P Trat = Probabilidade para o efeito de tratamento. ³Fração A = instantaneamente degradável, ⁴Fração B = lentamente degradável. ⁵Fração C = indigestível. ⁶Taxa fracional de degradação da Fração B, com r^2 de 0,89 para a soja crua e de 0,91 para soja tostada.

O aquecimento de carboidratos em presença de aminoácidos pode resultar em uma ligação entre ambos (Martins; JONGEN; BOEKEL, 2001), ao aquecer farelo de soja por duas horas a 149 °C. Verificou-se uma diminuição na solubilidade do nitrogênio comparado ao farelo de soja não aquecido (KUNG; HUBER, 1983). Realizando avaliação *in vitro*, Faldet, Son e Satter (1992) observaram redução na taxa de degradação da proteína da soja tostada comparada soja crua. A resposta positiva ao tratamento com soja tostada, verificada nos dois experimentos, deve ter sido determinada pelo maior aporte de aminoácidos metabolizáveis, oriundo da soja neste tratamento, sugerindo

que o fluxo de aminoácidos metabolizáveis estava sendo limitante ao desempenho no tratamento soja crua.

4 CONCLUSÕES

O ensaio de degradabilidade *in situ* demonstrou que o processo de tostagem foi efetivo em reduzir a degradação ruminal da proteína de soja, sendo verificada uma menor fração instantaneamente degradável, aumento da fração B e nenhum efeito na fração indigestível da proteína com uso do tratamento térmico.

A substituição de soja crua por soja tostada nos dois níveis de inclusão dietéticos testados resultou em ganho de produção de leite, sem afetar o consumo e a composição do leite, indicando que processamento térmico foi efetivo na indução de aumento no fluxo de aminoácidos metabolizáveis de soja para o animal.

ABSTRACT

In two experiments conducted in cross-over treatment design, the productive performance of Holstein dairy cows, receiving corn silage as the only forage in the diet, was used as a bioassay in order to evaluate the heat treatment of Alfa Nutrisoja (Cooperalfa, Chapecó, SC), a whole toasted soybean. In experiment 1, we used 22 cows fed with 3.7 % of the dry matter diet of raw or toasted whole soybeans. Replacing raw for toasted soybean increased milk production from 30.8 to 31.9 kg/day ($P=0.03$), total solids secretions ($P=0.04$) and lactose ($P = 0.01$), with no effect on the milk urea nitrogen (MUN) or dry matter intake (DMI). In experiment 2, sixteen cows tested substitution of soybean sources in 11% of diet DM. The toasted soybean diet promoted increased milk production (+1.1 kg/day; $P= 0.05$) and lactose (+0.06 kg/day; $P = 0.03$) with reduction in the concentration of plasma glucose (-3.4 mg/dL; $P = 0.01$). There was no effect from toasting on the digestibility of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber, as well as in the ingestive pattern of the animals. The content of MUN also was not affected, observing a tendency ($P=0.08$) of reducing the allantoin/creatinine ratio in urine using thermally processed soy. In the *in situ* soy protein sources degradability essay, we verified the reduction of the A fraction of total protein ($P<0.01$) and an increased in the B fraction ($P <0.01$) due to the toasting, with no significant difference ($P= 0.63$) in the indigestible fraction. The replacement of raw for toasted soybean at both tested levels of diet inclusion increased milk production without affecting intake or milk composition, demonstrating that the heat treatment was effective in inducing an increase in the flow of metabolizable soybean amino acids to the animal.

Keywords: Whole soybeans. Toasted soybeans. Rumen non-degradable protein.

REFERÊNCIAS

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American oil Chemists Society.** 4th ed. Champaign, 1989. 2 v.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 15th ed. Arlington, 1990. v. 1, 1094 p.

BERNARD, J. K. Effect of raw or roasted whole soybeans on digestibility of dietary nutrients on milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3231-3236, Dec. 1990.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details: international feed resources unit.** Bucksburn: Rowett Research Institute, 1995. 21 p.

DANFAER, A. Nutrient metabolism and utilization in the liver. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 39, n. 1, p. 115-127, June 1994.

DLKJ, H. J. et al. Extruded versus raw ground soybeans for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 12, p. 2521-2525, Dec. 1983.

DOEPEL, L.; LAPIERRE, H. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 7, p. 3264-3274, July 2010.

FALDET, M. A. et al. Chemical, *in vitro*, and *in situ* evaluation of heat-treated soybean proteins. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 8, p. 2548-2554, Aug. 1991.

FALDET, M. A.; SATTER, L. D. Feeding heat-treated full fat soybeans to cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 9, p. 3047-3054, Sept. 1991.

FALDET, M. A.; SON, Y. S.; SATTER, L. D. Chemical, *in vitro*, and *in vivo* evaluation of soybean heat-treated by various processing methods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 3, p. 789-795, Mar. 1992.

HSU, J. T.; SATTER, L. D. Procedures for measuring the quality of heat treated soybeans. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 6, p. 1353-1361, June 1995.

HUHTANEN, P.; RINNE, M.; NOUSIAINEN, J. A meta-analysis of feed digestion in dairy cows: 2., the effects of feeding level and diet composition on digestibility. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 10, p. 5031-5042, Oct. 2009.

KUNG, L. J.; HUBER, J. T. Performance of high producing cows in early lactation fed protein of varying amounts, sources, and degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 66, n. 2, p. 227-234, Feb. 1983.

LEMOSQUET, S. et al. Whole-body glucose metabolism and mammary energetic nutrient metabolism in lactating dairy cows receiving digestive infusions of casein and propionic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 12, p. 6068-6082, Dec. 2009.

MARTINS, S. I. F. S.; JONGEN, W. M. F.; BOEKEL, M. A. J. S. A review of maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 11, n. 9/10, p. 364-373, Sept. 2001.

MIELKE, C. D.; SCHINGOETHE, D. J. Heat-treated soybeans for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 7, p. 1579-1585, July 1981.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy, 2001. 381 p.

RUEGSEGGER, G. J.; SCHULTZ, L. H. Response of high producing dairy cows in early lactation to the feeding of heat-treated whole soybeans. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 68, n. 12, p. 3272-3279, Dec. 1985.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/STAT 9.1**. Cary, 2003. Software.

TREMBLAY, G. F.; BRODERICK, G. A.; ABRAMS, S. M. Estimating ruminal protein degradability of roasted soybeans using near infrared reflectance spectroscopy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 2, p. 276-282, Feb. 1996.

WHEELOCK, J. V.; ROOK, J. A. F. Lactose in the blood and urine of cows. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v. 33, p. 37-42, 1966.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 495-501, Mar. 1982.

ARTIGO 2 Methionine analog effect on performance, digestion, and plasma amino acids of dairy cows fed soybean diets

**Artigo normalizado de acordo com a norma para submissão do
Journal of Dairy Science**

**METHIONINE ANALOG EFFECT ON PERFORMANCE, DIGESTION,
AND PLASMA AMINO ACIDS OF DAIRY COWS FED SOYBEAN
DIETS**

INTRODUCTION

The consideration of amino acid (AA) absorption and requirements for fine tuning protein in lactating cow diets may improve cow performance, the efficiency of dietary N utilization, and the finances of dairy farming. Nutritional models used in practice estimate the disappearance of protein and AA from the intestinal lumen and assume a fixed efficiency value to support metabolic functions (NRC, 2001; Fox et al., 2004). Although mathematics in such models are known to not truly describe the complex biology of ruminants (Hanigan et al, 2006), they have sufficient accuracy to be used under field conditions (Pacheco et al., 2012). Model predictions suggest that Met is the first limiting AA for milk protein synthesis in diets formulated with soybeans as the main RUP source and corn grain and forage, justifying, under this widespread dietary scenario, the supplementation of dairy cows with Met sources.

The dietary supply of Met sources may increase milk protein yield and content, although response lacks consistency (Patton, 2010; Robinson, 2010). The magnitude and direction of the response depends on the N profile of the

basal diet (Phipps et al., 2008), stage of lactation (Schwab et al., 1992), type of product (Patton, 2010), synthetic capacity of the mammary gland (Burgos et al., 2010), among other factors. The content of AA in blood has been used to evaluate the response to Met supplementation, under the assumption that it would represent AA availability to the mammary gland. However, similarly to cow performance responses, Met sources effect on blood AA content is variable (Noftsker et al, 2005; St-Pierre and Sylvestre, 2005; Ordway et al., 2009).

The methionine hydroxyl analog supplement, 2-hydroxy-4-(methylthio)-butanoic acid (**HMB**), is a Met analog in which the α -amino group is substituted with a hydroxyl group, and its production is less expensive than that of DL-Met protected supplements. The possibility of HMB to be a source of Met to rumen microbes and to tissues, including the mammary gland, is well documented (Belasco, 1980; Lapierre et al., 2011). The isopropyl ester of HMB (**HMBi**) has been developed in an attempt to increase its rumen protectiveness (Graulet et al., 2005; Noftsker et al., 2005). After ingestion, HMBi is hydrolyzed to HMB and isopropanol during and before absorption by the rumen wall (McCollum et al., 2000; Breves et al., 2010). Very few HMB or HMBi is found in the omasal digesta (Noftsker et al, 2005) and only HMB is found in blood after HMBi infusion into the rumen (Graulet et al., 2005). A fraction of the rumen released HMB is oxidized to 2-keto-4-(methylthio) butanoic acid and further

transaminated into L-Met (Dibner and Knight, 1984) for incorporation in microbial protein (Belasco, 1980).

The isopropanol released during the hydrolytic cleavage of HMBi is rapidly absorbed by the rumen wall for oxidation to acetone by the liver (Graulet et al., 2005). Acetone may recycle to the rumen and is again reduced to isopropanol (Bruss and Lopez, 2000). The alcohol may affect microbial cell wall fluidity and transport of metabolites (Hui and Barton, 1973). Isopropanol had a concentration dependent negative impact on methane production in anaerobic bioreactors (Ince et al., 2011). HMBi may affect rumen microbes by a mechanism mediated by its alcohol metabolite.

Gil et al. (1973) demonstrated with mixed populations of rumen bacteria, urea as N source, and glucose or cellulose as substrate, that HMB or DL-Met addition can accelerate bacterial N incorporation and substrate digestion rate. Ruminant bacteria generally grow faster upon addition of AA and hence more efficiently, because of a diluted maintenance requirement (Van Kessel and Russell, 1996; Kajikawa et al., 2002). Rumen microbial growth and efficiency is improved by the supply of various AA, however, some AA inhibit the synthesis of others, and the inhibitory effect of one AA can be prevented by the supplementation of another AA (Kajikawa et al., 2002). Supplying AA to the rumen is a complex matter, in spite of being a vital feature of ruminant nutrition.

Phipps et al. (2008) evaluated the supplementation of diets varying in CP content (14.7% vs. 16.9%) with HMBi. The high CP diet was formulated by the inclusion of formaldehyde-treated soybean meal and rapeseed meal, at the same content of forages and corn grain as the low CP diet. HMBi decreased milk and all solids yield when added to the low CP diet, but increased milk protein yield when added to the high CP diet. The supplementation of Met analogs may interact with dietary CP, presumably when RDP limiting diets are formulated.

Two experiments were conducted to evaluate the HMBi supplementation of soybean based diets. Experiment 1 evaluated the response when the Met analog was added to diets differing in the proportion of RDP and RUP from soybeans, but capable of having similar microbial N flow synthesized under marginal RDP supply. We hypothesized that the variation in diet RDP content would determine the effect of HMBi on rumen function, while the variation in RUP would be a strategy to evaluate the response under increased flow of MP from soybeans. Experiment 2 was a controlled on-farm experiment to evaluate the supplementation of HMBi under the usual field condition of excess CP supply in relation to cow requirement. Our goal was to obtain *in vivo* information under differing diet CP strategies to evaluate rumen function as a mechanism on the response in plasma AA and cow performance to HMBi.

MATERIALS AND METHODS

Experimental procedures were approved by the Federal University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals (Protocol 040/2010).

Experiment 1

Twenty Holstein cows (100 ± 41 DIM, eight primiparous) formed five groups based on parity and milk yield. Within a group, cows were randomly assigned to a sequence of four treatments, in concurrently run 4 x 4 Latin Squares, with 21-day periods, 14 d of adaptation, and balanced for carry-over effects. Treatments were formed by a 2 x 2 factorial arrangement of coarsely ground raw or heated whole soybeans (Alfa Nutrisoja. Cooperativa Agroindustrial Alfa, Chapecó, Brazil) and HMBi (MetaSmart. Adisseo Inc., Antony, France). Heated and raw soybeans originated from the same batch of seeds. The Protein Dispersibility Index (PDI) of the heated soybeans was 10.5% of the CP. The HMBi was orally given to each cow twice per day, at a daily dosage of 30 g.

Diet formulation was based on NRC (2001) recommendations (Table 1). The goal was to achieve zero N balance in the rumen for the heated soybeans diet, while approaching 6% ether extract (**EE**) in diet DM. The complete substitution of heated by raw soybeans would result in decreased flow to the intestine of AA from soybeans RUP and a more positive RDP balance. HMBi

supplementation would occur in diets theoretically differing in intestinal absorption of AA and ruminal RDP supply from soybeans, but similar in MP supply from rumen bacteria.

Cows were individually fed in sand bedded tie stalls. The TMRs were mixed in a stationary mixer (Unimix 1200, Casale Equipamentos Ltda, São Carlos, Brazil) and offered twice per day, approximately at 6 a.m. and 2 p.m. Feed ingredients and refusals per cow were sampled daily and composite samples formed and analyzed per period. Corn silage and refusals were dried in a forced air oven at 55°C for 72 h and ground through a 1 mm mesh screen. The DM content was determined by drying at 100°C for 24 h and CP by micro-Kjeldahl analysis (AOAC, 1990). The EE was analyzed according to AOAC (1990) after hydrolysis with hydrochloric acid. Ash was analyzed by incineration at 550°C for 8 h. The NDF was analyzed using a TE-149 fiber analyzer (TECNAL Equipamentos para Laboratórios, Piracicaba, Brazil) based on the procedure of Van Soest et al. (1991) with amylase and sodium sulfide. The nutrient composition of the offered TMR (Table 1) was calculated from the feeds composition (Table 2) and the total amount of each feed DM consumed along the experiment, calculated assuming that the ingredient composition of the refusal was the same as the offered TMR, on a DM basis. The nutrient composition of the consumed diet considered the nutrient composition of the refusal from each cow and was calculated for each treatment by the ratio of total

nutrient intake to total DMI. A nutrient selection index was created based on the procedure of Leonardi et al. (2005). Values below 100% indicate selective refusals, above 100% is preferential consumption, and equal to 100% is no nutrient selection.

Cows were milked three times per day, starting at 4:30 a.m., 12:30 p.m., and 8 p.m. Milk sampling started on the 15th day of the period. Solids and MUN content of nine consecutive milk samples were measured (Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa, Curitiba, Brazil) by infrared analysis (Bentley 2000. Bentley Instruments Inc., Chaska, MN). Milk energy secretion (**Milk E**, Mcal/d) was: $[(0.0929 \times \% \text{fat}) + (0.0547 \times \% \text{protein}) + (0.0395 \times \% \text{lactose})] \times \text{kg of milk}$ (NRC, 2001). After the morning milking, BW was determined on days 19 and 20, and BCS was evaluated, both to describe experimental units.

Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, and non-NDF OM was determined on days 18 to 20 by total collection of feces by trained personnel concurrently to defecation. The fecal output was collected and weighted during three 8-hour sampling periods, by delaying the next sampling period by 8 h, in order to not induce major disturbance to the animals, although representing a 24-hour period. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and a composite sample was formed. The total

urinary output was collected simultaneously to fecal sampling to estimate the relative rumen microbial synthesis based on purine derivate excretion. A 10% sulfuric acid solution was immediately added to the urine samples (1:9), before refrigeration at 4°C. Composite urine samples were diluted 1:3 with distilled water and frozen at -20°C. Allantoin was analyzed as in Young and Conway (1942) and creatinine and uric acid by laboratory kits (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil).

Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on day 21 to determine plasma urea-N (**PUN**). Samples were obtained immediately before the first daily feeding and 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, and 21 h after feeding. The blood, collected with EDTA, was immediately refrigerated, centrifuged at 1,000 x g for 15 min, and the plasma was frozen at -20°C. The PUN content was analyzed with a laboratory kit (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brazil). Equal volume aliquots of each plasma sample formed daily composites per cow. The AA content of composite samples was analyzed by reversal phase HPLC separation and UV detection at 254 nm in a commercial laboratory (Laboratório Cean, Santa Maria, Brazil). Plasma glucose content 12 h post-feeding was analyzed with a laboratory kit (Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil).

Experiment 2

A final data set of 234 Holstein cows (96 primiparous and 138 multiparous) was generated from an initial sample of 294 cows paired blocked based on parity and milk yield. Usage of data from a cow was based on having reliable laboratorial values, on its presence during the entire experimental period, and on the availability of data for all measured variables. Milk yield during three consecutive days was used for blocking and as a covariate in the statistical model. Within parity, cows in a block were split to two free stall barns. One barn of primiparous and one of multiparous cows were supplemented with HMBi (MetaSmart, 35 g/d) and the other two acted as Control. Barns were fed the same batch of TMR three times per day. The supplied amount of HMBi was adjusted daily based on group size and was top dressed and mixed to the first daily meal (50% of daily offer) simultaneously to feed delivery, by four members of the research team housed at the farm during the experiment. The experimental TMR was the only feed available. Treatments were offered for 28 d and the response was evaluated on days 24 to 28.

The composition of the formulated diet was defined by the farm. The diet contained (% of DM): 38.8% corn silage, 5% green chop Tifton, 10.4% soybean meal, 8.6% heated soybeans (Alfa Nutrisoja), 16.9% mature ground corn, 8.6% citrus pulp, 4.7% whole cottonseed, 3.6% corn gluten feed, and 3.5% minerals,

vitamins, and additives (Megalac, sodium bicarbonate, live yeast, Mycofix, sugarcane molasses, selenized yeast). In order to ascertain that diet composition and availability was not a factor on the response to HMBi, samples from each batch of TMR (3/d) were obtained at five locations of the feed bunk of all barns on days 24 to 28. A composite barn sample was formed per day and frozen until analysis of DM, CP, and NDF, as previously described. On days 25 to 29, daily feed refusals were weighted and sampled for analysis. The DMI of the barn was calculated, as well as the quantity of feed refusal as a proportion of the offered TMR.

Similarity of cows across treatments was ascertained by the evaluation of BCS and by taping the girth perimeter by four independent appraisers. Individual cow milk yield was measured on days 24 to 28, and the contents of solids, MUN, and CCS analyzed by infrared on samples obtained on day 26. A spot urine sample from each cow was randomly obtained within days 24 to 28 for analysis of allantoin and creatinine. The urinary allantoin to creatinine ratio was assumed to be descriptive of the relative rumen microbial yield. Simultaneously to urine sampling, a blood sample was obtained from the coccygeal vessels for the analysis of PUN and AA. Sample processing and laboratory methods were the same as previously described.

Statistical Analysis

All data was analyzed using PROC MIXED of SAS (SAS Institute, 2003). A $P < 0.05$ was interpreted as statistically significant, a $P < 0.10$ as a trend, and a $P < 0.15$ as a weak trend.

Experiment 1. The model for variables obtained once during each experimental period had the random effect of cow (1 to 20) and the fixed effects of period (1 to 4), soybean (Raw vs. Heated), methionine (Met vs. Control), and the interaction of soybean and methionine. For the variable obtained over time (PUN), to the previous model was added the effects of sampling time (1 to 10) and its two and three term interactions with soybean and methionine. The interaction of cow, period, soybean and methionine was defined as random. Covariance structures evaluated were Simple, First Order Autoregressive, Unstructured, and Compound Symmetry. The best covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian Criterion.

Experiment 2. The response in milk yield used a model containing the continuous covariate effect (milk yield before treatments allocation), the random effect of block, and the fixed effect of methionine (Met vs. Control). For variables measured once, a similar model was used, but without the covariate term. Data on DMI and diet composition used the barn as the experimental unit ($n=2/\text{treatment}$) and were analyzed as repeated measures over time. The model

contained the fixed effects of methionine, sampling day (1 to 5), and the interaction of methionine and sampling day. Barn nested within methionine was defined as random. Covariance structures evaluated were the same as in Experiment 1.

RESULTS

Experiment 1

Heated and raw soybeans had similar CP and EE content, although NDF differed by 7.7% of DM (Table 2). The preferential consumption of CP and EE and the selective refusal of NDF increased the CP content of the consumed diet to 15.8% of DM, a 0.5% of DM increase compared to the offered TMR (Table 1). Selective sorting in favor of N was not avoided by offering a TMR to allow for 15% refusal (Table 1), and diets that were not excessively dry ($56.5 \pm 0.16\%$ DM on an as fed basis).

As the ingredient composition of feed refusals is not measurable, model simulation of the diets (Tables 3 and 4) used the intake of analyzed ingredients (Table 2) in the offered TMR (Table 1) and cow response to the treatments (Table 5). The NRC (2001) and CNCPS (AMTS v.3.4.6, Cortland, NY) models estimated that the replacement of heated for raw soybeans increased diets RUP as % of CP by 3.3% units (Table 3) and by 6.6% units (Table 4), respectively. Rumen RDP balance of the heated soybeans diets was slightly negative based on

NRC (2001) (Table 3), although bacterial MP flow was similar (1293 g/d for raw vs. 1292 g/d for heated soybeans). Based on CNCPS, there was no ruminal limitation of NH_3 and peptides in any diet (Table 4). The predicted flow of MP increased 122 g/d based on NRC (2001) and 267 g/d based on CNCPS (Tables 3 and 4) when heated substituted raw soybeans.

Based on NRC (2001), raw soybeans without HMBi supplied 6.70% Lys in MP and 1.88% Met in MP (3.57:1), and heated soybeans 6.58% and 1.84% (3.58:1) (Table 3). CNCPS estimates for raw soybeans were 6.66% Lys in MP and 2.14% Met in MP (3.11:1), and for heated soybeans 6.62% and 2.07% (3.19:1) (Table 4). Revised NRC recommendations for maximum milk protein content are 6.83% Lys and 2.28% Met in MP (3.00:1), and for protein yield 7.14% and 2.37% (3.01:1), while recommendations based on AMTS v.3.3.4 are 6.97% Lys and 2.53% Met in MP (2.75:1) for protein content and 6.93% and 2.34% (2.96:1) for protein yield (Whitehouse et al., 2013). The contents of Lys and Met in MP were below recommended levels, but were similar for diets varying in soybean source (Tables 3 and 4).

The NRC (2001) estimated that HMBi resulted in Lys/Met in MP of 3.10:1 for raw and 3.13:1 for heated soybeans (Table 3). Similar CNCPS estimates were 2.73:1 and 2.84:1, respectively (Table 4). The Met content in MP based on NRC (2001) was 2.16% for raw and 2.08% for heated soybeans, and

based on CNCPS they were 2.43% and 2.32%, respectively (Tables 3 and 4), around the recommendations of Whitehouse et al. (2013). HMBi decreased Lys/Met in MP, but had no impact on the predicted flow of digestible AA, except for Met.

The replacement of raw for heated soybeans increased milk yield from 34.6 to 37.8 kg/d ($P<0.01$), as well as the daily yields of fat, protein, lactose, and total solids (Table 5). Milk E and feed, N, and energy efficiencies also showed positive responses to heated soybeans ($P<0.01$). The supplementation of HMBi did not improve cow performance. Milk E/DMI tended to be increased when HMBi was added to raw soybeans, but reduced when it was added to heated soybeans ($P=0.10$ for the interaction of soybean and methionine).

Raw soybeans increased MUN ($P=0.04$) and PUN ($P<0.01$) content (Table 5). The HMBi decreased PUN in both diets ($P=0.05$), without affecting MUN ($P=0.43$). The decrease in PUN induced by HMBi and by heated soybeans was consistent along the day, although there was a marked sampling time effect upon the variable (Figure 1).

The various measures of the relative rumen microbial yield were decreased by HMBi ($P<0.04$), and soybeans had no detectable effect ($P>0.16$) (Table 6). There was no evidence for treatment effects on total tract apparent digestibility of nutrients ($P>0.33$) and on plasma glucose content ($P>0.55$)

(Table 7). Energy intake, estimated as Digestible OM Intake (DOMI), was similar across treatments ($P>0.52$).

Heated soybeans increased plasma Met content ($P=0.05$) and tended to increase the contents of Ser ($P=0.14$) and Cys ($P=0.15$) (Table 1). Met was the only AA showing statistical increase in plasma concentration in response to increased RUP supply from soybeans. Heated soybeans increased plasma Met content without changing plasma Lys ($P=0.46$), reducing Lys/Met from 4.08:1 to 3.76:1. Plasma Cys content was decreased by HMBi ($P=0.02$), but no response was detected in Met content ($P=0.55$) (Table 1). The interaction of soybean and methionine had P values of 0.10 for Leu, 0.12 for Val, 0.14 for Ile, and 0.07 for Ile+Leu+Val (Table 1). The content of plasma branched chain amino acids tended to decrease when HMBi supplemented heated soybeans, and the opposite effect occurred when HMBi supplemented raw soybeans.

Experiment 2

Feed availability and diet composition did not determine the response to treatments for the on-farm experiment. There was similarity across treatments on feed availability and DMI, as well as for the analyzed composition of the offered TMR, feed refusals, and the consumed diet (Table 2). The CP content of the diet was around 17% of DM, supposedly excessive in relation to cow requirement. Soybean protein was the major RUP source and high dietary CP density was not achieved by the inclusion of NPN. Daily variation was observed for some

parameters describing the feed management (Table 2), however, there was no indication of a treatment by day interaction.

The supplementation of HMBi increased milk protein yield (+47 g/d, $P=0.05$) and content (+0.11%, $P=0.03$) (Table 3). The contents of lactose (+0.06%, $P=0.12$) and total solids (+0.21%, $P=0.11$) also tended to respond to HMBi. Average DIM, SCC, cow size, and BCS were similar ($P>0.21$), showing that the blocking procedure was efficient for the achievement of cow homogeneity across treatments.

A single blood sampling of a large number of cows was capable of detecting a reduction in PUN in response to HMBi ($P=0.02$) (Table 4). Similarly to Experiment 1, no detectable response in MUN was observed, although MUN content was numerically lower for HMBi ($P=0.20$).

In contrast to Experiment 1, HMBi increased the urinary allantoin to creatinine ratio ($P=0.03$) (Table 4). Increased ruminal microbial yield was associated to a positive effect of HMBi on the plasma content of 10 AA at $P<0.04$, two at $P<0.07$, and three at $P<0.13$ (Table 5). The plasma concentration of Cys ($P=0.60$) and Lys ($P=0.18$) experienced only numerical increases in response to HMBi. The plasma content of total AA was increased by 10.4% of Control ($P<0.01$). The proportional increase in plasma Met was the highest among the AA evaluated, approaching 30.8% of Control.

DISCUSSION

The goal of obtaining diets with low, but sufficient, RDP content was achieved in Experiment 1. The replacement of heated by raw soybeans did not determine rumen microbial yield or diet digestibility and increased PUN and MUN, as expected. Raw soybeans seemingly increased soybeans RDP in the diet, while heated soybeans increased predicted soybeans RUP and total dietary AA absorption. Based on the similarities in diet composition, plasma glucose content, and DOMI, it is not expected that the change from heated to raw soybeans hormonally mediated the capacity of the mammary gland to synthesize protein (Burgos et al., 2010), suggesting that treatment responses were driven by the difference in diet CP profile, at similar CP density.

Substantial increases in the yields of milk and solids and in milk lactose content were elicited by heated soybeans in Experiment 1. The proportional increase in the daily yields of lactose (+10.6%) and fat (+9.7%) exceeded the increase in milk protein yield (+7.5%). Cows fed heated soybeans also had greater feed, N, and energy efficiencies than those fed raw soybeans (Table 5). As there was no detectable gain in DOMI, the increase in total AA absorption may have increased glucose availability for lactose synthesis, a generally accepted mechanism in the regulation of milk secretion (Schingoethe, 1996). Increased gluconeogenesis from non-essential AA (Lemosquet et al., 2009) and the use by the mammary gland of energy sources alternative to glucose (Doepel

and Lapierre, 2010) in response to increased MP flow from heated soybeans is consistent with the increase in lactose secretion, at similar plasma glucose content.

Plasma AA concentration did not increase in response to heated soybeans, except Met. It suggests that greater usage of AA for milk protein synthesis drained plasma AA in CP limiting diets, maintaining plasma AA concentration constant, even with increased AA absorption from the diet. Other nutrient, probably glucose availability, may have been the primary driver of milk synthesis. Absorbed essential AA apparently supported the increased demand for AA of the mammary gland. Theoretical CNCPS estimates of the flows of absorbed essential AA as a proportion of the requirement were similar for raw and heated soybeans (Table 4). The capability of the diet to increase milk lactose secretion apparently explained the response in the yield of milk and solids to increased soybean MP.

The increase in plasma Met concentration in response to heated soybeans was not anticipated. Soybean protein does not have greater Met content than rumen microbial protein (NRC, 2001), suggesting that the increase in plasma Met was not diet derived. Plasma Met accumulation decreased Lys/Met in plasma and was followed by small increases in Cys and Ser content. Although the increases in plasma Ser and Cys were not supported by strong statistical evidence, the metabolic linkage among these AA suggests that the response was

biologically meaningful. Transsulfuration results in transfer of the sulfur of Met to serine to form Cys (Rao et al., 1990). The turnover of body protein and peptide releases free Met and Cys into the body pools (Stipanuk, 2004). The acute increase in milk yield elicited by heated soybeans, a known feature of increased essential AA supply (Doepel and Lapierre, 2010), probably induced body tissue mobilization to meet an increased nutrient demand. Apparently, BW and BCS were insensitive measures of subtle short term changes in body reserves, understandably in a reversal design experiment. The concept of Met as the first limiting AA may be dually interpreted based on the data of Experiment 1. Since plasma Met accumulation was positively related to cow performance, it could be argued that the increase in plasma Met content was the result of excessive Met availability in relation to other AA, or, on contrary, it was the increase in plasma Met that enhanced Met availability to the mammary gland, contributing to the gain in milk synthesis.

The HMBi supplement did not determine cow performance in Experiment 1. Under limited dietary CP supply, decreasing Lys/Met in MP with HMBi had no major impact on milk secretion. There was not a significant soybean by methionine interaction, suggesting that reducing Lys/Met in MP, at the dietary CP profile of Experiment 1, did not change the response to the Met analog. Addition of HMBi to both soybean diets reduced rumen microbial yield and induced no response in plasma AA content, except for a decrease in plasma Cys.

Noftsgger et al. (2005) detected a decrease in plasma Tau in response to HMBi feeding. The sulfur from either Met or Cys ends up being oxidized via the Cys catabolic pathways to the end products sulfate and taurine, when sulfur amino acids are in excess, the enzymes involved in their catabolism are upregulated (Stipanuk, 2004). The decrease in Cys suggests that Met flow may have been reduced in response to HMBi, probably because of decreased absorption of bacterial MP. As DOMI was similar across treatments (Table 7), decreased rumen microbial yield in response to HMBi may have been the result of a reduction in the efficiency of microbial growth, as suggested by the ratio of urinary purine derivatives excretion over DOMI (Table 6).

However, in Experiment 2, the on-farm addition of HMBi to a 17% CP diet increased milk protein yield and content and the plasma concentration of various AA, particularly Met, plausibly as the result of increased rumen microbial yield. Increased flow of AA in response to HMBi may also be the effect of a greater proportion of ruminal carbon being used for the synthesis of AA rather than to generate VFA, then more dietary preformed AA would be available to the cow (Fowler, 2009). There was major variation between experiments for the plasma content of each AA (Tables 8 and 12). It is unknown whether this variation was the result of the different nature of the plasma samples (composite of 10 daily bleedings or one bleeding within a 5-day interval) or an animal/diet effect, but it suggests that plasma AA analysis has

little value as a nutritional tool in dairy herds. The magnitude of the positive response in milk protein secretion to HMBi paralleled the response to protected DL-Met supplements (Patton, 2010). The diverging response to HMBi feeding in Experiments 1 and 2 was apparently rumen mediated.

It is assumed that around 50% of the consumed HMBi is converted to HMB in the rumen (Graulet et al., 2005; Noftsger et al., 2005) and 100% generates isopropanol before or during absorption through the rumen wall (Graulet et al., 2005; Breves et al., 2010). A fraction of HMB is aminated to L-Met for incorporation into microbial protein (Belasco, 1980). The steps in the synthesis of L-Met from DL-HMB involve the oxidation to 2-keto-4-(methylthio) butanoic acid, followed by transamination (Dibner and Knight, 1984). Branched chain amino acid transferase, present in many bacteria, is known to transaminate 2-keto-4-(methylthio) butanoic acid into Met, preferentially using Ile, Leu, and Val as amino donors (Sekowska et al., 2004). Limitation in the ruminal availability of branched chain AA could theoretically limit Met synthesis from HMB, and consequently its beneficial effect on rumen function (Gil et al., 1973). This mechanism is a plausible explanation for the trends of occurrence of an interaction between the soybean and the methionine effects for the plasma contents of Ile, Leu, and Val in Experiment 1. When RDP supply was increased by raw soybeans, HMBi tended to increase the plasma content of the branched chain AA, probably in response to slightly improved

rumen microbial synthesis, but plasma branched chain AA content was reduced when the analog was added to heated soybeans. It may explain this same pattern of response for the soybean by methionine interaction on feed efficiency (Milk E/DMI). When ruminal AA was limited by heated soybeans, the usage of branched chain AA in transamination reactions may have limited their absorption. Supplementing dairy cows with a mixture of HMBi, Ile, Leu, and Val may benefit rumen function more than the Met analog in pure form, especially when N limiting diets are adopted, although this hypothesis requires evaluation.

Also, when there is limitation in ruminal availability of AA, the positive effect of Met on microbial growth and efficiency may not be as accentuated as when AA supply is plenty. Kajikawa et al. (2002) observed that a mixture of AA was more effective in improving microbial growth and efficiency than single AA addition. The stimulatory effect of the combined AA on bacterial growth declined when various AA, including Met, were removed from the media, implying that Met or Met precursors could stimulate microbial growth under high rumen AA availability. When AA supply is plenty, the negative impact of one AA on another AA synthesis would also be compensated by the dietary supply of the inhibited AA, and the inhibitory effect of one AA could be prevented by the supply of another AA (Kajikawa et al., 2002). In conjunction, all these mechanisms may have been involved in the positive impact of HMBi

on rumen microbial yield and plasma AA content in Experiment 2, in which excessive dietary CP supply was adopted by the farm.

Heated soybeans induced positive performance response in Experiment 1, while HMBi also elicited gain in performance in Experiment 2. The increase in soybean MP supply induced by heated soybeans boosted the daily yields of milk and all solids, without changing total plasma AA content. Heated soybeans did not have a major impact on the components defined value per unit of milk, but increased income per cow per day, as a result of increased milk sales. Under current Brazilian condition (July, 2013), the milk yield response elicited by heated soybeans (+2.2 kg/d) would increase income per cow by at least US\$ 1.30/d. In Experiment 2, increased flow of bacterial MP in response to HMBi increased plasma AA concentration and milk protein content (+0.11%) and yield (+47 g/d), but had no effect on milk yield. Income per cow would be increased by at most US\$ 0.20/d, as the result of a milk protein premium at this level of cow production per day. If the regulatory mechanisms modulating the differential response to these feeding strategies were completely understood, the financial response to AA nutrition could be improved.

The HMBi supplement reduced rumen microbial yield in Experiment 1, in which N limiting diets were formulated. When rumen AA supply was not plenty, subtle limitations in AA availability may have limited microbial growth. The isopropanol generated during HMBi hydrolysis may recycle as acetone to

the rumen, where it can be again reduced to isopropanol (Bruss and Lopez, 2000). The actual concentration of isopropanol in rumen fluid may be greater than would be predicted from the daily molar intake of HMBi, implying that *in vitro* experiments may not be sufficient models to evaluate isopropanol effects on rumen microbial metabolism (Plank, 2011). Alcohols can affect microbial cell wall fluidity and alter the transport of metabolites (Hui and Barton, 1973), which may limit AA incorporation into the cells, particularly when AA supply is scarce. Fowler (2009) observed increased accumulation of free Met in the Met pool when HMBi was added to a continuous culture system. Isopropanol also reduced methanogenesis from acetate in anaerobic bioreactors by reducing the transcript abundance of acetyl-CoA synthetase (Ince et al., 2011), suggestive of a potentially toxic effect on rumen function. The ruminal digestibility of NDF and hemicellulose and the production of VFA were reduced when HMBi replaced DL-Met *in vitro*, although there was no change in OM digestibility (Fowler, 2009). When rumen AA supply is plenty, the limitation in AA uptake by the bacteria may not be as damaging to rumen function as when N limiting diets are formulated, a plausible explanation for the interaction between HMBi supplementation and dietary CP content (Phipps et al., 2008). Ruminal AA availability may have modulated the difference in rumen microbial yield in response to HMBi in Experiments 1 and 2.

A common feature of Experiments 1 and 2 was the decrease in PUN in response to HMBi. This may support the use of Met analogs as a strategy to mitigate N excretion to the environment in ruminants. The possibility of improving the reproductive efficiency of dairy cows by reducing PUN with HMBi supplementation deserves evaluation. The conversion of DL-HMBi into L-Met, both at the tissue and rumen level, involves the incorporation of NH_3 from transaminated AA, a plausible explanation for the decreased PUN. A large decrease in PUN content 1 h post feeding was observed when HMBi supplemented raw soybeans (Figure 1), suggesting that HMBi also inhibited ruminal protein deamination. This is in accordance with the findings of Fowler (2009), in which HMBi reduced the concentration and flow of NH_3N in rumen fluid, increased the concentration of peptides, and increased the proportion of microbial N originating from $\text{NH}_3\text{-N}$. Results from that author suggest that HMBi decreased deamination of feed AA or more likely increased the synthesis of AA from carbon skeletons and NH_3 . Reduction in MUN in response to HMBi has been observed (St-Pierre and Sylvestre, 2005), although this variable was not as sensitive as PUN to the variation imposed to the diets in our experiment.

CONCLUSIONS

The HMBi increased milk protein yield and content when it supplemented a diet with excess CP content. When the Met analog was added to soybean-CP limiting diets, there was no detectable cow performance response,

neither an interaction with diet CP profile. Under limited ruminal AA supply, HMBi decreased rumen microbial yield, while it was increased when HMBi was added to a CP excessive diet. The response in plasma AA and cow performance to HMBi was rumen mediated.

REFERENCES

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. Vol. I. 15th ed. Association of Official Analytical Chemist, Arlington, VA.
- Belasco, I. J. 1980. Fate of carbon-14 labeled methionine hydroxy analog and methionine in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 63:775-784.
- Breves, G., B. Schröder, W. Heimbeck, and R. A. Patton. 2010. Short communication: Transport of 2-hydroxy-4-methyl-thio-butanoic acid isopropyl ester by rumen epithelium in vitro. *J. Dairy Sci.* 93:260-264.
- Bruss, M. L., and M. J. Lopez. 2000. Mixed ruminal microbes of cattle produce isopropanol in the presence of acetone but not 3-D-hydroxybutyrate. *J. Dairy Sci.* 83:2580-2584.
- Burgos, S. A., M. Dai, and J. P. Cant. 2010. Nutrient availability and lactogenic hormones regulate mammary protein synthesis through the mammalian target of rapamycin signaling pathway. *J. Dairy Sci.* 93:153–161.

- Dibner, J. J., and C. D. Knight. 1984. Conversion of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid to L-methionine in the chick: A stereospecific pathway. *J. Nutr.* 144:1716-1723.
- Doepel, L., and H. Lapierre. 2010. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows in response to essential and nonessential amino acid infusions. *J. Dairy Sci.* 93: 3264–3274.
- Fowler, C. M. 2009. Evaluation of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester and methionine supplementation on efficiency of microbial protein synthesis and rumen bacterial populations. MS Thesis. Ohio State University, Columbus.
- Fox, D. G., L. O. Tedeschi, T. P. Tytlutki, J. B. Russell, M. E. Van Amburgh, L. E. Chase, A. N. Pell, and T. R. Overton. 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112:29–78.
- Gil, L. A., R. L. Shirley, and J. E. Moore. 1973. Effect of methionine hydroxy analog on bacterial protein synthesis from urea and glucose, starch or cellulose by rumen microbes, in vitro. *J. Anim. Sci.* 37:159-163.

- Graulet, B., C. Richard, and J. C. Robert. 2005. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxyl analog isopropyl ester. *J. Dairy Sci.* 88:3640–3649.
- Hanigan, M. D., H. G. Bateman, J. G. Fadel, J. P. McNamara. 2006. Metabolic models of ruminant metabolism: recent improvements and current status. *J. Dairy Sci.* 89(E.Suppl.):E52-E54.
- Hui, F. K., and P. G. Barton. 1973. Mesomorphic behaviour of some phospholipids with aliphatic alcohols and other non-ionic substances. *Biochim. Biophys. Acta* 296:510–517.
- Ince, B., G. Koxsel, Z. Cetecioglu, N. A. Oz, H. Coban, and O. Ince. 2011. Inhibition effect of isopropanol on acetyl-CoA synthetase expression level of acetoclastic methanogen, *Methanosaeta concilii*. *J. Biotechnol.* 156:95-99.
- Kajikawa, H., M. Mitsumori, and S. Ohmomo. 2002. Stimulatory and inhibitory effects of protein amino acids on growth rate and efficiency of mixed ruminal bacteria. *J. Dairy Sci.* 85:2015–2022.
- Lapierre, H., M. Vázquez-Añón, D. Parker, P. Dubreuil, G. Holtrop, and G. E. Lobley. 2011. Metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate (HMTBA) in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:1526-1535.

- Lemosquet, S., E. Delamaire, H. Lapiere, J. W. Blum, and J. L. Peyraud. 2009. Effects of glucose, propionic acid, and nonessential amino acids on glucose metabolism and milk yield in Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:3244–3257.
- Leonardi, C., F. Giannico, and L. E. Armentano. 2005. Effect of water addition on selective consumption (sorting) of dry diets by dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 88:1043–1049.
- McCollum, M. Q., M. Vazquez-Anon, J. J. Dibner, and K. E. Webb Jr. 2000. Absorption of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoic acid by isolated sheep ruminal and omasal epithelia. *J. Anim. Sci.* 78:1078–1083.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirement of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Nat. Acad. Sci., Washington, DC.
- Noftsker, S., N. R. St-Pierre, and J. T. Sylvester. 2005. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 88:223–237.
- Ordway, R. S., S. E. Boucher, N. L. Whitehouse, C. G. Schwab, and B. K. Sloan. 2009. Effects of providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on feed intake and lactational performance. *J. Dairy Sci.* 92:5154–5166.

- Pacheco, D., R. A. Patton, C. Parys, and H. Lapierre. 2012. Ability of commercially available dairy ration programs to predict duodenal flows of protein and essential amino acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:937-963.
- Patton, R. A. 2010. Effect of rumen-protected methionine on feed intake, milk production, true milk protein concentration, and true milk protein yield, and the factors that influence these effects: A meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 93:2105–2118.
- Phipps, R. H., C. K. Reynolds, D. I. Givens, A. K. Jones, P. Geraert, E. Devillard, and R. Bennett. 2008. Short communication: Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid isopropyl ester on milk production and composition of lactating Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:4002–4005.
- Plank, J. E. 2011. Methionine and methionine analog supplementation: comparison of bioavailability in dairy cows and differential utilization by rumen microbes in batch culture. MS Thesis. Ohio State University, Columbus.
- Rao A. M., M. R. Drake, and M. H. Stipanuk. 1990. Role of the transsulfuration pathway and of γ -cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *J. Nutr.* 120: 837–845.

- Robinson, P. H. 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine levels on the performance of lactating dairy cows: A systematic review of the literature. *Livest. Sci.* 127:115-126.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT 9.1. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schingoethe, D. J. 1996. Dietary influence on protein level in milk and milk yield in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 60:181–190.
- Schwab, C. G., C. K. Bozak, N. L. Whitehouse, and M. M. Mesbah. 1992. Amino acid limitation and flow to duodenum at four stages of lactation. 1. Sequence of lysine and methionine limitation. *J. Dairy Sci.* 75:3486–3502.
- Sekowska, A., V. Dénervaud, H. Ashida, K. Michoud, D. Haas, A. Yokota, and A. Danchin. 2004. Bacterial variations on the methionine salvage pathway. *BMC Microbiol.* 4:9-26.
- Stipanuk, M. H. 2004. Sulfur amino acid metabolism: pathways for production and removal of homocysteine and cysteine. *Annu. Rev. Nutr.* 24:539-577.
- St-Pierre, N. R., and J. T. Sylvester. 2005. Effects of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid (HMB) and its isopropyl ester on milk production and composition by Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 88:2487–2497.

- Van Kessel, J. S., and J. B. Russell. 1996. The effect of amino nitrogen on the energetic of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. *J. Dairy Sci.* 79:1237-1243.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharide in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Whitehouse, N. L., C. G. Schwab, T. Tylutki, and B. K. Sloan. 2013. Optimal lysine and methionine concentrations for milk protein production as determined with the latest versions of Dairy NRC (2001) and AMTS-Cattle. *J. Dairy Sci.* 96(E-Suppl. 1):253.
- Young, E. G., and Conway, C.F., 1942. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.*, 142:839-852.

Table 1. Composition of the offered TMR, of the consumed diet, and of the refusals on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM) (% of DM). Experiment 1

	R	RM	H	HM
Offered TMR				
Corn silage	38.5	38.5	38.4	38.4
Tifton hay	7.8	7.8	7.8	7.8
Raw soybeans	12.9	12.9		
Heated soybeans			13.1	13.1
Soybean meal	5.0	5.0	4.9	4.9
Finely ground mature corn	24.2	24.2	24.1	24.1
Citrus pulp	8.3	8.3	8.2	8.2
Urea	0.4	0.4	0.4	0.4
Minerals, vitamins, buffers ¹	2.9	2.9	2.9	2.9
CP	15.3	15.3	15.3	15.3
NDF	34.7	34.7	35.7	35.7
Ether extract	5.8	5.8	5.8	5.8
Ash	7.9	7.9	7.9	7.9
NFC	36.4	36.4	35.3	35.3
Refusal (Mean±SD, n=20)				
CP	12.3±1.4	11.9	12.0±1.2	12.1±1.8
NDF	38.4±3.3	38.3±5.0	39.0±	39.3±3.6
Ether extract	4.4±1.0	4.5±1.0	4.7±0.9	4.9±0.9
Ash	8.3±1.1	8.5±1.5	8.6±1.3	8.7±1.3
NFC	36.5±3.6	36.8±5.2	35.7±3.6	34.9±3.8
Refusal, % of offered as fed	16.2±2.4	16.3±2.3	15.6±2.6	16.2±2.5
Refusal, % of offered DM	14.4±2.4	14.7±2.3	14.0±2.2	14.2±2.2
Consumed diet				
CP	15.8	15.8	15.8	15.8
NDF	34.1	34.1	35.2	35.1
Ether extract	6.0	6.0	6.0	6.0
Ash	7.8	7.8	7.8	7.8
NFC	36.3	36.3	35.2	35.3
Sorting ²				
CP	103	104	103	103
NDF	98	98	98	98
Ether extract	104	104	103	103
Ash	99	99	99	98
NFC	100	100	100	100

¹% of diet DM: 0.9 MgO, 0.9 sodium bicarbonate, 0.3 salt, 1.2 limestone, 0.3 minerals and vitamins (per kg): 200 g Ca; 156 g P; 35 g S; 30 g Mg; 150 mg Co; 2,000 mg Cu; 200 mg I; 82 mg Se; 5,000 mg Mn; 11,900 mg Zn; 1,000 KUI vit. A; 220 KUI vit. D; 6.2 KUI vit. E. ²<100=selective refusals, >100=preferential consumption, 100=no selection.

Table 2. Composition of feed samples (Mean±SD, n=4). Experiment 1

	DM	CP	NDF	EE	Ash
	% of as fed	% of DM			
Corn silage	34.6±1.3	7.8±0.2	51.2±1. 2	4.6±0.2	5.9±0.3
Tifton hay	90.1±1.1	13.5±1. 1	74.5±0. 9	3.0±0.5	7.8±0.1
Raw soybeans	88.3±1.1	40.3±0. 3	26.1±1. 3	17.7±0. 5	5.6±0.3
Heated soybeans	89.7±1.2	39.8±0. 6	33.8±1. 2	18.1±0. 7	5.8±0.3
Soybean meal	88.8±0.7	48.5±0. 3	16.6±1. 6	3.6±0.6	7.1±0.5
Finely ground corn	86.6±1.0	7.6±0.3	12.3±1. 4	3.9±0.1	1.4±0.1
Citrus pulp	87.4±1.2	7.0±0.2	24.1±1. 6	4.3±0.2	7.0±0.1

Table 3. Diet NRC (2001) estimates based on animal response and intake of ingredients on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1

	R	RM	H	HM
MP allowable milk, kg/d	38.0	37.8	40.2	41.9
ME allowable milk, kg/d	45.9	45.3	45.5	47.7
RUP, % of CP	32.0	32.0	35.3	35.3
RDP balance, g/d	62	62	-44	-47
MP required, g/d	2206	2227	2307	2373
MP supplied ¹ , g/d	2348	2355	2413	2534
MP balance, g/d	141	121	106	155
MP - Bacterial, g/d	1294	1293	1267	1317
MP - RUP, g/d	943	944	1035	1095
MP - Endogenous, g/d	110	110	110	116
Lys, % of MP	6.70	6.67	6.58	6.55
Met ¹ , % of MP	1.88	2.16	1.84	2.08
Lys/Met	3.57	3.10	3.58	3.13
d Arg, g/d	115	115	116	121
d His, g/d	53	53	54	56
d Ile, g/d	116	116	117	122
d Leu, g/d	205	205	209	218
d Lys, g/d	157	157	159	166
d Met ¹ , g/d	44	51	44	53
d Phe, g/d	117	117	118	124
d Thr, g/d	116	116	117	122
d Val, g/d	128	128	130	136
Total d essential AA, g/d	1051	1058	1064	1118

¹Assume that 30 g of MetaSmart would provide 6.6 g of d Met.

Table 4. Diet CNCPS (AMTS v.3.4.6) estimates based on animal response and intake of ingredients on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1

	R	RM	H	HM
MP allowable milk, kg/d	35.7	35.6	40.8	42.8
ME allowable milk, kg/d	41.3	40.9	40.0	42.6
RUP, % of CP	37.3	37.6	43.5	44.5
Milk urea nitrogen, mg/dL	11.8	11.8	11.1	11.0
Rumen NH ₃ , % of required	171	171	146	145
Peptides, % of required	189	189	167	166
MP required, g/d	2292	2314	2412	2487
MP supplied, g/d	2338	2347	2541	2677
MP balance, g/d	46	32	129	190
MP - Bacterial, g/d	1213	1212	1223	1267
MP - RUP, g/d	1125	1134	1318	1410
Lys, % of MP	6.66	6.64	6.62	6.58
Met, % of MP	2.14	2.43	2.07	2.32
Lys/Met	3.11	2.73	3.19	2.84
MP Arg, g/d	153	153	164	172
MP His, g/d	62	62	67	70
MP Ile, g/d	117	117	125	131
MP Leu, g/d	182	182	195	205
MP Lys, g/d	156	156	168	176
MP Met, g/d	50	57	53	62
MP Phe, g/d	117	117	122	128
MP Thr, g/d	111	111	118	124
MP Try, g/d	32	32	34	35
MP Val, g/d	126	126	135	142
Total MP essential AA, g/d	1106	1113	1181	1245
Arg, % of required	115	114	116	119
His, % of required	148	147	151	154
Ile, % of required	118	117	119	121
Leu, % of required	112	111	114	116
Lys, % of required	129	128	132	135
Met, % of required	138	156	138	158
Phe, % of required	174	172	172	176
Thr, % of required	164	162	165	168
Try, % of required	136	135	135	168
Val, % of required	111	109	112	114

Table 5. Performance, milk (MUN) and plasma (PUN) urea-N, and intake on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1

	R	RM	H	HM	SEM	PS ¹	PM	PS*
	kg/d							
DMI	23.4	23.4	23.4	24.5	0.39	0.15	0.1	0.17
Milk	34.5	34.8	37.5	38.0	0.50	<0.0	0.4	0.91
Fat	1.039	1.08	1.16	1.16	0.025	<0.0	0.4	0.43
Protein	0.994	1.01	1.07	1.08	0.016	<0.0	0.2	0.98
Lactose	1.552	1.55	1.71	1.72	0.027	<0.0	0.7	0.91
Solids	3.878	3.93	4.27	4.30	0.069	<0.0	0.5	0.81
	%							
Fat	3.02	3.10	3.11	3.06	0.052	0.64	0.7	0.24
Protein	2.89	2.91	2.85	2.87	0.025	0.13	0.5	0.96
Lactose	4.51	4.48	4.58	4.55	0.037	0.05	0.4	0.98
Solids	11.26	11.3	11.4	11.3	0.097	0.33	0.9	0.55
	mg/dL							
MUN	13.3	12.9	12.5	12.5	0.28	0.04	0.4	0.48
PUN	15.6	15.3	14.5	14.0	0.21	<0.0	0.0	0.74
	Mcal/d							
MilKE2	21.2	21.7	23.4	23.5	0.39	<0.0	0.4	0.66
	Mcal/kg							
MilKE/DMI	0.91	0.94	1.01	0.97	0.179	<0.0	0.7	0.16
MilKE/DMI ³	1.42	1.46	1.60	1.52	0.041	<0.0	0.6	0.17
	Ratio							
Milk/DMI	1.48	1.50	1.61	1.56	0.026	<0.0	0.5	0.19
N Milk ⁴ /N	0.26	0.27	0.28	0.28	0.005	0.01	0.8	0.28
	Kg							
BW	616	614	614	617	2.6	0.75	0.9	0.41
	1 to 5							
BCS	3.47	3.48	3.45	3.45	0.024	0.32	0.8	0.86

¹Probabilities for the effects of soybean (S), methionine (M), and interaction (S*M). ²Milk energy secretion. ³Milk E/Digestible OM intake. ⁴N in Milk = Milk Protein/6.38.

Table 6. Urinary volume, allantoin (Alla), uric acid (UA), and creatinine (Crea) on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1

	R	RM	H	HM	SEM	PS ¹	PM	PS*M
	L/d							
Urine	16.3	15.9	16.8	16.8	0.63	0.26	0.74	0.74
	mmoles/d							
Alla	297	248	281	252	16.9	0.73	0.02	0.56
UA	45	36	39	33	2.8	0.12	0.01	0.74
Alla+UA	352	285	322	277	19.0	0.32	<0.01	0.57
	ratio							
Alla/Crea	2.00	1.71	1.97	1.76	0.121	0.97	0.03	0.72
UA/Crea	0.30	0.25	0.27	0.24	0.022	0.45	0.04	0.68
Alla+UA/Crea	2.35	2.01	2.24	2.00	0.152	0.70	0.04	0.73
	mmoles/kg							
Alla+UA/DOMI ²	23.9	19.8	22.1	18.2	1.34	0.21	0.01	0.92

¹Probabilities for the effects of soybean (S), methionine (M), and interaction (S*M). ²Digestible OM intake.

Table 7. Total tract apparent digestibility of nutrients (% of intake), plasma glucose, and digestible OM intake (DOMI) on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1

	R	RM	H	HM	SEM	PS ¹	PM	PS*M
DOMI, kg/d	14.8	14.8	14.7	15.2	0.32	0.52	0.46	0.48
Glucose, mg/dL	54.2	53.8	53.0	54.1	1.28	0.76	0.76	0.55
D DM ²	68.2	68.7	67.6	67.7	0.79	0.33	0.72	0.78
D OM ²	69.9	70.4	69.7	69.6	0.76	0.53	0.75	0.71
D NDF ²	53.3	54.3	53.9	53.9	1.07	0.90	0.62	0.62
D Non-NDF OM ²	79.6	79.8	79.3	79.2	0.80	0.59	0.95	0.86

¹Probabilities for the effects of soybean (S), methionine (M), and interaction (S*M). ²Digestibilities of DM, OM, NDF, and non-NDF OM

Table 8. Plasma AA (g/100 g of plasma) on treatments Raw Soybeans (R), Raw Soybeans + Met (RM), Heated Soybeans (H), and Heated Soybeans + Met (HM). Experiment 1

	R	RM	H	HM	SEM	PS ¹	PM	PS*M
Ala	0.346	0.357	0.367	0.356	0.0078	0.21	0.97	0.17
Arg	0.411	0.427	0.428	0.431	0.0143	0.46	0.51	0.68
Asp	0.666	0.638	0.666	0.662	0.0207	0.19	0.95	0.88
Cys	0.150	0.131	0.155	0.145	0.0062	0.15	0.02	0.44
Glu	0.916	0.904	0.946	0.930	0.0276	0.31	0.61	0.93
Gly	0.263	0.258	0.281	0.267	0.0095	0.18	0.27	0.60
His	0.352	0.365	0.353	0.319	0.0310	0.47	0.74	0.46
Ile	0.215	0.228	0.227	0.216	0.0083	0.98	0.88	0.14
Leu	0.671	0.724	0.703	0.691	0.0197	0.96	0.30	0.10
Lys	0.633	0.643	0.622	0.606	0.0329	0.46	0.93	0.69
Met	0.156	0.154	0.165	0.162	0.0041	0.05	0.55	0.90
Phe	0.320	0.337	0.336	0.326	0.0103	0.83	0.72	0.20
Pro	0.362	0.387	0.388	0.378	0.0171	0.63	0.67	0.32
Ser	0.481	0.485	0.511	0.509	0.0186	0.14	0.96	0.87
Thr	0.552	0.554	0.579	0.565	0.0177	0.30	0.74	0.65
Tyr	0.452	0.487	0.482	0.474	0.0160	0.61	0.41	0.18
Val	0.568	0.598	0.590	0.547	0.0233	0.54	0.79	0.12
Total	7.480	7.672	7.793	7.577	0.1792	0.55	0.94	0.26
Lys/Met	4.04	4.21	3.75	3.76	0.171	0.03	0.60	0.63
Met/Cys	1.13	1.24	1.17	1.23	0.040	0.78	0.04	0.48
Ile+Leu+Val	1.453	1.550	1.519	1.453	0.0459	0.74	0.73	0.07

¹Probabilities for the effects of soybean (S), methionine (M), and interaction (S*M).

Table 9. Intake, diet and refusal composition during five days of feed bunk sampling of two barns on treatments Control or HMBi. Experiment 2

	Control	HMBi	SEM	<i>PT</i> ¹	<i>PD</i>	<i>PT</i> * <i>D</i>
	kg/d					
DMI	19.5	19.1	0.46	0.59	0.11	0.99
	% of offered as fed					
Refusal	4.9	5.6	0.54	0.16	<0.01	0.43
	% of as fed					
TMR DM	43.4	43.9	0.65	0.64	0.02	0.80
Refusal DM	38.7	41.2	2.02	0.48	0.07	0.28
	% of DM					
Offered TMR CP	17.0	17.2	0.30	0.67	0.29	0.45
Offered TMR NDF	37.3	36.7	0.40	0.34	0.58	0.71
Refusal CP	16.1	16.6	0.32	0.36	0.94	0.15
Refusal NDF	39.3	41.5	2.13	0.54	0.01	0.15
Consumed diet CP	17.1	17.3	0.41	0.71	0.28	0.46
Consumed diet NDF	37.2	36.5	0.50	0.40	0.55	0.76

¹Probabilities for the effects of treat (T), day (D), and interaction (T*D)

Table 10. Performance of dairy cows on treatments Control or Met. Experiment 2

	Control	HMBi	SEM	<i>P</i>
Number of cows	114	120		
DIM, d	189	196	5.5	0.40
Milk before ¹ , kg/d	34.6	34.6	0.08	0.95
Milk, kg/d	34.6	34.8	0.53	0.83
Fat, kg/d	1.091	1.116	0.0278	0.56
Fat, %	3.18	3.23	0.074	0.69
Protein, kg/d	1.049	1.096	0.0156	0.05
Protein, %	3.07	3.18	0.031	0.03
Lactose, kg/d	1.589	1.609	0.0233	0.58
Lactose, %	4.57	4.63	0.022	0.12
Solids, kg/d	4.037	4.133	0.0582	0.28
Solids, %	11.72	11.93	0.088	0.11
SCCLn ² , 1 to 9	3.52	3.22	0.237	0.41
BCS, 1 to 5	2.66	2.72	0.035	0.21
Girth perimeter, cm	203	204	0.6	0.52
Milk energy ³ , Mcal/d	22.16	22.72	0.358	0.30

¹Milk yield before treatments allocation (covariate). ²Linear SCC. ³Milk energy secretion.

Table 11. Plasma (PUN) and milk (MUN) urea nitrogen and the ratio of allantoin to creatinine in urine of dairy cows on treatments Control or Met. Experiment 2

	Control	HMBi	SEM	<i>P</i>
PUN, mg/dL	15.6	13.9	0.45	0.02
MUN, mg/dL	16.4	15.7	0.37	0.20
Allantoin/Creatinine	1.85	2.20	0.095	0.03

Table 12. Plasma AA (g/100 g of plasma) of dairy cows on treatments Control or HMBi. Experiment 2

	Control	HMBi	SEM	<i>P</i>
Ala	0.267	0.300	0.0073	<0.01
Arg	0.353	0.384	0.0079	0.01
Asp	0.534	0.573	0.0170	0.12
Cys	0.417	0.432	0.0195	0.60
Glu	0.748	0.809	0.0233	0.07
Gly	0.228	0.247	0.0069	0.06
His	0.223	0.244	0.0092	0.13
Ile	0.191	0.212	0.0035	<0.01
Leu	0.547	0.621	0.0134	<0.01
Lys	0.679	0.710	0.0158	0.18
Met	0.129	0.167	0.0052	<0.01
Phe	0.302	0.358	0.0080	<0.01
Pro	0.322	0.369	0.0149	0.03
Ser	0.445	0.500	0.0182	0.04
Thr	0.422	0.458	0.0149	0.11
Tyr	0.257	0.311	0.0104	<0.01
Val	0.479	0.521	0.0108	<0.01
Total	6.545	7.218	0.1059	<0.01
Lys/Met	5.41	4.36	0.202	<0.01
Met/Cys	0.32	0.40	0.019	<0.01
Ile+Leu+Val	1.217	1.355	0.0165	<0.01

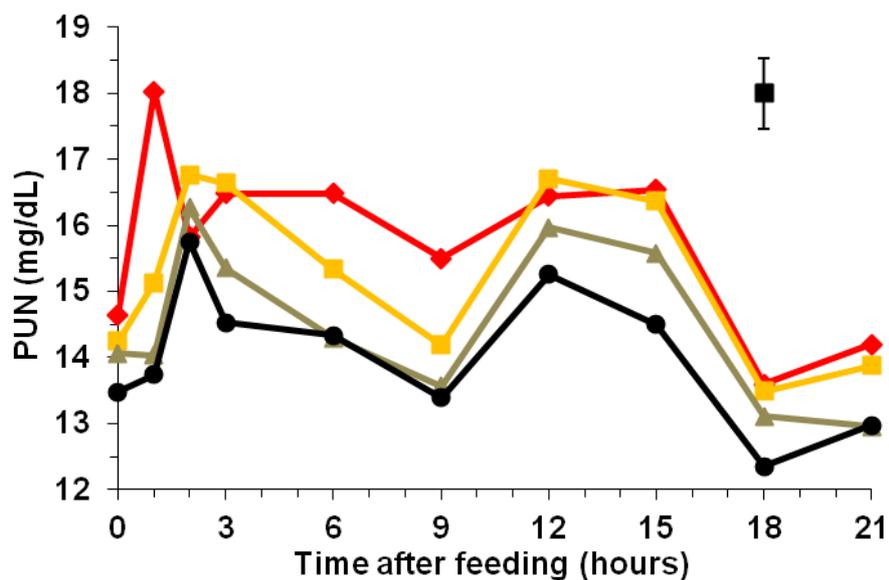


Figure 1. Plasma urea nitrogen (PUN) on treatments Raw Soybeans + Met (■), Raw Soybeans (◆), Heated Soybeans + Met (●), and Heated Soybeans (▲)

Nota: $P < 0.01$ for Soybean, $P = 0.05$ for Methionine, $P = 0.74$ for Soybean*Methionine, $P < 0.01$ for Time, $P = 0.97$ for Soybean*Time, $P = 0.96$ for Methionine*Time, $P = 0.56$ for Soybean*Methionine*Time.