



RICARDO PEIXOTO DE MELO

**SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA
DEGRADAÇÃO RUMINAL PARA VACAS LEITEIRAS
ALIMENTADAS COM DIETAS DE ALTA OU BAIXA
PROTEÍNA**

LAVRAS – MG

2022

RICARDO PEIXOTO DE MELO

**SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL
PARA VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETAS DE ALTA OU BAIXA
PROTEÍNA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA,
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Melo, Ricardo Peixoto de.

Suplementação de metionina protegida da degradação
ruminal para vacas leiteiras alimentadas com dietas de alta ou
baixa proteína / Ricardo Peixoto de Melo. – 2020.

79 p.: il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Balanço de nitrogênio. 2. Eficiência de uso do nitrogênio.
3. Aminoácidos no plasma. 4. Modelos nutricionais. 5. Função
ruminal. I. Pereira, Marcos Neves. II. Título.

RICARDO PEIXOTO DE MELO

**SUPLEMENTAÇÃO DE METIONINA PROTEGIDA DA DEGRADAÇÃO RUMINAL
PARA VACAS LEITEIRAS ALIMENTADAS COM DIETAS DE ALTA OU BAIXA
PROTEÍNA**

**RUMEN PROTECTED METHIONINE FOR DAIRY COWS ON HIGH OR LOW
PROTEIN DIETS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 31 de agosto de 2020.

Dra. Carla Luiza Silva Ávila	UFLA
Dra. Fernanda Lopes	ADISSEO
Dr. Márcio André Stefanelli Lara	UFLA
Dra. Marina Camargo de Arruda Danés	UFLA

Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS – MG
2022**

Dedico

Ao Prof Raimundo Vicente de Souza *in memoriam*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria Dilma, minha avó Clélia e minha esposa Leandra, pelo exemplo e inspiração.

Ao meu pai Amador e aos meus irmãos Kariny e Otton pelo apoio e aos tios Aldo e Goreti a quem sempre serei grato.

Ao Professor Marcos pelo conhecimento e exemplo de competência e comprometimento. Aqui me despeço como orientado, mas continuo seu aluno. Muito obrigado por tudo.

Ao amigo Lívio Ribeiro Molina pelo incentivo e pelas sábias palavras.

Ao Grupo Rehagro, em especial ao Fábio e ao Clóvis, pela confiança e apoio incondicional.

Aos amigos Eugênio, Lucas Castro, Wesley, Karina, Joseane, Isis Kiska e Fabiana.

Ao Grupo do Leite em especial à Karla, Vitória, Josué, Augusto e Lucas Carneiro pelo esforço, dedicação e apoio na condução dos experimentos.

À Better Nature em nome da Renata, Rayana, Carlinhos, Sr. Antonio (*in memoriam*), Sebastião e Geraldo pela contribuição e apoio.

À Fernanda por sua participação na banca e a quem agradeço em nome da ADISSEO pelo financiamento parcial do projeto.

À Prof Carla, Prof Marina e ao Prof Márcio pela disponibilidade e contribuição para a tese.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo e à UFLA por me acolher por 12 anos.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

RESUMO GERAL

A suplementação de vacas leiteiras com metionina protegida no rúmen (RPM) pode aumentar a produção e o teor de proteína do leite, mas a resposta pode ser dependente do perfil protéico da dieta basal. O objetivo deste experimento foi avaliar a suplementação de RPM em dietas à base de farelo de soja com diferentes teores de proteína. Os tratamentos foram proteína baixa 15,6 (LCP) ou alta 17,2 (HCP) em arranjo fatorial sem suplementação (CTL) ou com suplementação de RPM (0,07% de Smartamine M na dieta DM). Todas as dietas continham 0,3% de uréia na MS. A relação lisina/metionina na proteína metabolizável foi de 2,9 para dietas com RPM e 3,5 para CTL. Dezesesseis vacas da raça Holandês (96 dias no leite) foram distribuídas em quatro quadrados latinos 4×4 , com períodos de 21 dias e 14 dias de adaptação. O modelo estatístico continha o efeito aleatório de vaca e os efeitos fixos de período, proteína (PT), metionina (MET) e a interação entre PT e MET. A significância foi declarada em $P \leq 0,05$ e as tendências em $P \leq 0,10$. A produção de leite (37,2 kg/d) e o consumo de MS (24,7 kg/d) não diferiram. As produções e as concentrações de caseína e proteína aumentaram para HCP. RPM reduziu a concentração de lactose no leite, tendeu a aumentar a concentração de gordura e aumentou as concentrações de proteína e caseína no leite apenas na HCP. As dietas de alta proteína aumentaram o N-uréico no leite e no plasma e a proporção do N ingerido na urina e reduziu a proporção no leite, aumentou a síntese de proteína microbiana, mas não teve efeito na digestibilidade dos nutrientes do trato digestivo total. RPM aumentou a digestibilidade da fibra em detergente neutro e da matéria orgânica e não teve efeito sobre a síntese de proteína microbiana e a partição do N consumido no leite, fezes e urina. A digestibilidade do amido no trato digestivo total e a concentração de glicose no plasma foram aumentadas por RPM apenas na dieta HCP. O teor de proteína da dieta não afetou as concentrações plasmáticas de aminoácidos (AA). RPM aumentou a concentração plasmática de metionina e reduziu a relação lisina:metionina e tendeu a aumentar as concentrações AA essencial, arginina e lisina. A concentração plasmática dos AA de cadeia ramificada, leucina e histidina foram aumentadas por RPM apenas em HCP. O alto teor de proteína na dieta aumentou a secreção de proteína no leite, mas reduziu a eficiência do uso de N na lactação. A eficiência marginal de conversão de RPM em proteína do leite foi maior com a dieta de alta proteína. A concentração plasmática de AA não refletiu a mudança no perfil proteico da dieta e a concentração plasmática de metionina foi um marcador plausível da capacidade de uma fonte RPM de fornecer metionina digestível, independentemente do teor de proteína da dieta. A consideração da necessidade ruminal de proteína verdadeira pode favorecer a função ruminal quando dietas com baixa proteína são adotadas.

Palavras-chave: Balanço de nitrogênio Eficiência de nitrogênio. Aminoácidos plasmáticos. Modelos de proteínas. Função ruminal.

GENERAL ABSTRACT

The supplementation of dairy cows with rumen-protected methionine (RPM) can increase milk protein yield and content, but the response may be dependent on the protein profile of the basal diet. The objective of this experiment was to evaluate the supplementation of RPM to soybean meal based diets varying in protein profile. Treatments were protein levels low 15.6 (LCP) or high 17.2 (HCP) in factorial arrangement with no supplementation (CTL) or supplementation with RPM (0.07% of Smartamine M in diet DM). All diets had 0.3% of urea in DM. The predicted lysine to methionine ratio in MP was 2.9 for diets with RPM and 3.5 for CTL. Sixteen Holstein cows (96 days in milk) were assigned to four 4×4 Latin Squares, with 21-day periods, and 14 days of adaptation. The statistical model contained the random effect of cow and the fixed effects of period, protein (PT), methionine (MET), and the interaction between PT and MET. Significance was declared at $P \leq 0.05$ and trends at $P \leq 0.10$. Milk yield (37.2 kg/d) and DM intake (24.7 kg/d) did not differ. The yields and concentrations of casein and protein were increased by HCP. The RPM reduced milk lactose concentration, tended to increase fat concentration, and increased milk protein and casein concentrations only with diet HCP. High protein increased milk and plasma urea-N, increased the proportion of N intake in urine and reduced the proportion in milk, increased rumen microbial yield, but had no effect on total tract nutrient digestibility. The RPM increased neutral detergent fiber and OM digestibilities and had no effect on rumen microbial yield and the partitioning of N intake into milk, feces, and urine. The total tract digestibility of starch and plasma glucose concentration were increased by RPM only in diet HCP. The protein content of the diet did not affect plasma amino acid (AA) concentrations. The RPM increased the concentrations of plasma methionine and reduced the ration of lysine to methionine and tended to increase the concentrations of total of essential AA, arginine, and lysine. Branched chain AA, leucine, and histidine were increased by RPM only in HCP. High protein in the diet increased milk protein secretion but reduced the efficiency of N usage for lactation. The marginal efficiency of converting RPM protein to milk protein was higher with the high protein diet. Plasma AA concentration did not reflect the change in diet protein profile and plasma methionine concentration was a plausible marker of the capacity of a RPM source to supply digestible methionine, independently of dietary protein content. The consideration of the ruminal requirement for true protein may favor rumen function when low protein diets are adopted.

Keywords: Nitrogen balance. Nitrogen efficiency. Plasma amino acids. Protein models. Rumen function.

LISTA DE FIGURA

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Relação entre a ingestão e a excreção diária de N nas fezes (●), urina (□) e no leite (Δ).....	14
---	----

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGO 1

Table 1. Feeds composition (% of DM). Mean \pm standard deviation of 4 samples.	72
Table 2. Composition and particle size distribution of the total mixed ration with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine	73
Table 3. Dry matter intake (DMI), lactation performance, body condition score (BSC), and body weight (BW) with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine.....	74
Table 4. Predicted protein and amino acids (AA) supplies (NRC, 2001) based on actual intake, cow performance and size, and feed composition during the experiment for treatments with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine.....	75
Table 5. Plasma glucose, urinary allantoin (Alla) excretion and total-tract apparent digestibility (D) of nutrients with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine.....	77
Table 6. Milk (MUN) and plasma (PUN) urea-N and N in milk, feces, and urine with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine	78
Table 7. Plasma amino acids ($\mu\text{mol/L}$) with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) or without (CTL) rumen protected methionine	79

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	11
1 INTRODUÇÃO	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Partição do nitrogênio ingerido em vacas leiteiras	13
2.2 Utilização do nitrogênio ureico no leite (NUL) como ferramenta para monitorar a partição do nitrogênio em vacas leiteiras	16
2.3 Efeito do teor de proteína bruta da dieta sobre a partição do nitrogênio ingerido em vacas leiteiras	17
2.4 Disponibilidade de proteína para síntese de proteína microbiana no rúmen	19
2.5 Proteína não-degradável no rúmen e eficiência de uso do nitrogênio em vacas leiteiras	25
2.6 Aminoácidos limitantes do desempenho leiteiro	26
2.7 Métodos de proteção de aminoácidos da degradação ruminal	29
2.8 Resposta de vacas leiteiras à suplementação com metionina protegida da degradação ruminal	31
2.9 Efeito da metionina sobre a concentração plasmática de glicose e aminoácidos	34
REFERÊNCIAS	37
SEGUNDA PARTE – ARTIGO	48
ARTIGO 1 - Rumen protected methionine for dairy cows on high or low protein diets	48

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O excesso de proteína na dieta de vacas leiteiras aumenta a perda de nitrogênio (N) dietético pela urina e pelas fezes e reduz a eficiência de utilização do nitrogênio (EUN) para a síntese de proteína no leite (CASTILLO *et al.*, 2000; HUHTANEN *et al.*, 2008). A redução do teor de proteína da dieta pode resultar em ganho financeiro para o produtor (FADUL-PACHECO *et al.*, 2017), melhora na eficiência reprodutiva do rebanho (SINCLAIR *et al.*, 2014) e menor impacto negativo do N excretado sobre o ambiente (ROTZ *et al.*, 1999). Apesar das possíveis vantagens financeiras e ambientais, dietas com teor proteico acima do recomendável para atender a exigência nutricional de proteína metabolizável (PM) (FOX *et al.*, 2004; NATIONAL RESEARCH COUNCIL [NRC], 2001) são frequentemente utilizadas em rebanhos leiteiros. Uma justificativa frequente para a não redução da proteína na dieta é a possibilidade de perda de produção de leite, mesmo com ganho em EUN (BRODERICK, 2003; OLMOS COLMENERO; BRODERICK, 2006b). Entretanto, um levantamento de 9707 amostras de dieta completa oriundas de 13 estados norte-americanos e analisadas por um laboratório comercial entre 2007 e 2015 sugere que a adoção de dietas de baixo teor proteico tem crescido, mesmo sem ser observada redução no teor de N-uréico no leite (NUL) no mesmo período (HRISTOV *et al.*, 2018). Avaliar estratégias nutricionais para dietas de baixo teor proteico é pertinente, visando obter a máxima EUN compatível com a alta produtividade animal.

A suplementação com metionina protegida da degradação ruminal (RPM) tem sido proposta como estratégia nutricional para reduzir o teor proteico da dieta sem induzir perda no desempenho leiteiro (CHEN *et al.*, 2011). Dietas de baixo teor proteico podem responder positivamente em produção de proteína no leite à suplementação com metionina e lisina, apesar da resposta ser de baixa magnitude (SINCLAIR *et al.*, 2014). Robinson (2010) estimou que a resposta em produção de leite à suplementação com metionina ou metionina e lisina foi maior com maior teor de proteína na dieta basal, além da possibilidade de induzir ganho em EUN. A meta-análise de Leão *et al.* (2017) também sugere que dietas com mais de 16% de proteína bruta (PB) foram mais responsivas à suplementação com RPM do que dietas com menos que 16% de PB. A suplementação com RPM em dietas deficientes em PM não manteve a produção de leite e de proteína em relação a uma dieta adequada em PM (GIALLONGO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2012a). Quando um precursor de metionina (HMBi) foi suplementado em dieta de

baixa PB, houve queda na síntese de proteína microbiana (PMic) no rúmen e não houve efeito positivo em síntese de proteína no leite (PEREIRA *et al.*, 2021), sugerindo que eventos ruminais podem determinar a resposta de vacas leiteiras à suplementação de aminoácidos (AA). Entretanto, não foi observado efeito sobre a produção de leite e de proteína da interação entre o teor de proteína da dieta e a suplementação com RPM, quando a PB da dieta foi maior que 16.1% da matéria seca (MS) (BRODERICK *et al.*, 2008; BRODERICK; STEVENSON; PATTON, 2009; LEONARDI; STEVENSON; ARMENTANO, 2003). O efeito do perfil proteico da dieta sobre a resposta marginal em síntese de proteína no leite à suplementação com RPM requer mais avaliação.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de RPM em dietas com alta ou baixa proteína sobre o consumo de matéria seca (CMS), a síntese PMic no rúmen, a digestibilidade de nutrientes, a concentração de AA no sangue, a EUN e o desempenho leiteiro. Nossa hipótese é que dietas de baixa proteína aumentam a EUN sem penalizar o desempenho leiteiro e a suplementação com RPM induz maior ganho marginal na secreção de proteína no leite na dieta de alta proteína.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Partição do nitrogênio ingerido em vacas leiteiras

Estratégias que aumentam a EUN são capazes de minimizar o impacto negativo da produção animal sobre o meio ambiente. As principais rotas de perda de N ocorrem pelas fezes e pela urina (TAMMINGA, 1992). Quando a capacidade de induzir perda de N por volatilização de amônia ou denitrificação a óxido nitroso no solo foi avaliada em fezes separadamente da urina, o N urinário foi mais poluidor que o N fecal (LESSA *et al.*, 2014). Existe potencial para atuar nutricionalmente na EUN e no impacto ambiental do N excretado por atuação na rota de excreção (ROTZ *et al.*, 1999). Entretanto, em sistemas de produção de gado de leite confinados onde urina e fezes normalmente se misturam, e também muitas vezes ocorre inclusão de água ou remoção parcial de sólidos dos dejetos (BORTON *et al.*, 1995), o efeito da rota de excreção de N pelo animal (fezes ou urina) sobre o impacto ambiental negativo do N no esterco requer avaliação.

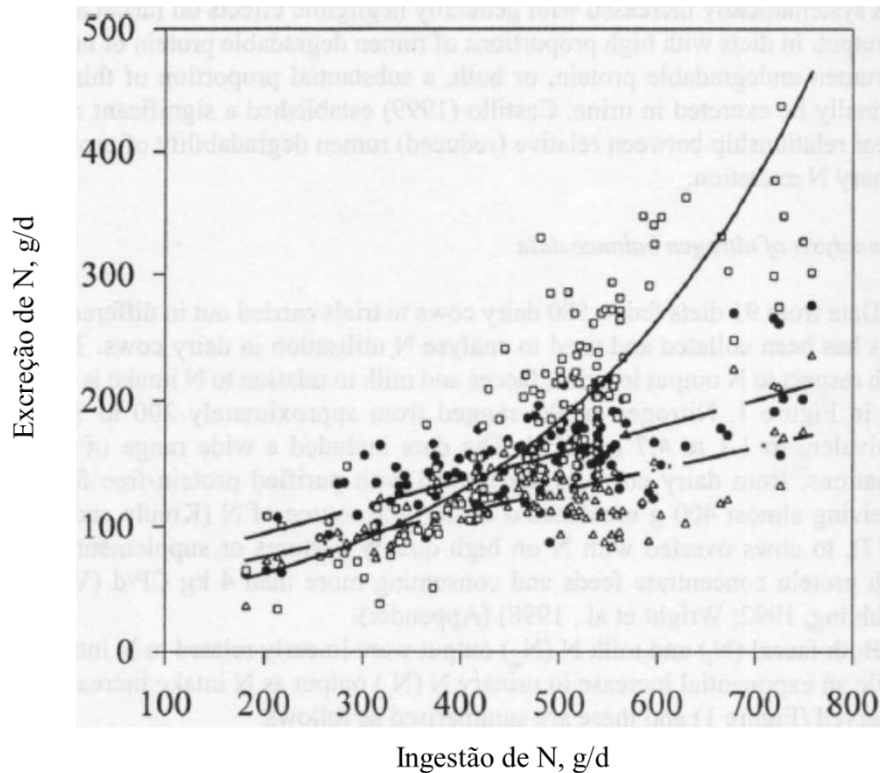
Perdas de N através do pêlo ou por descamação e secreções da pele são pouco expressivas (SPANGHERO; KOWALSKI, 1997). A perda fecal corresponde ao N da proteína alimentar, da PMic e da proteína da secreção endógena não digerida no intestino (TAMMINGA, 1992). A digestibilidade da proteína alimentar é normalmente alta fazendo com que a proteína endógena contribua proporcionalmente em maior quantidade para o N fecal (HUHTANEN *et al.*, 2008). Para uma dieta com 16% de PB na MS e um CMS de 20 kg/d, o N fecal foi de 165 g/d e 69% de origem endógena. O N endógeno pode ser expresso em função do CMS (NRC, 2001; SPEK *et al.*, 2013), o que pode justificar o comportamento linear da excreção de N nas fezes com o aumento da ingestão (CASTILLO *et al.*, 2000; OLMOS COLMENERO; BRODERICK, 2006a).

Castillo *et al.* (2000) observaram um aumento linear na excreção de N no leite com o aumento da ingestão de N (Figura 1). Entretanto, Reynal e Broderick (2005) observaram um aumento quadrático para a excreção de N no leite com o aumento do teor de PB da dieta. Resultado similar foi reportado por Olmos Colmenero e Broderick (2006a) ao avaliarem teores crescentes de PB na dieta (13,5, 15,0, 16,5, 17,9 e 19,4% da MS) o que resultou em aumento na excreção de N no leite, 173, 180, 185, 177, 180 g/d até o teor de 16,5%.

A perda urinária engloba a ureia oriunda da amônia não incorporada na PMic no rúmen e todo o N oriundo da proteína metabolizável (PM) não utilizado para manutenção, produção de leite e ganho de tecido corporal (TAMMINGA, 1992). Contrariamente ao observado para a

excreção fecal, a perda urinária de N tem um aumento exponencial com o aumento da ingestão de N a partir de 400 g/d (FIGURA 1). Em ingestão excessiva de N, a perda urinária aumenta proporcionalmente em maior magnitude que a perda fecal ou a capacidade de incorporação de N no leite (SPEK *et al.*, 2013).

Figura 1 – Relação entre a ingestão e a excreção diária de N nas fezes (●), urina (□) e no leite (Δ)



Fonte: Adaptado de Castillo *et al.* (2000).

As perdas de N nas fezes, na urina e no leite são mensuráveis em laboratório, enquanto que a retenção (ou mobilização) de N é calculada por dedução do N excretado do total ingerido. O cálculo de retenção de N engloba o erro de mensuração das três rotas de excreção. Retenção positiva ocorre quando ocorre ganho de tecido corporal ou fetal. A EUN para a síntese de proteína no leite ($N_{\text{leite}}/N_{\text{ingerido}}$) pode ser avaliada pela conversão da excreção de PB do leite a N por divisão pelo fator 6,38 (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2005b). A EUN é uma ferramenta simples para uso prático já que pode ser avaliada independentemente da mensuração do N fecal e urinário.

Spanghero e Kowalski (1997) analisando 125 dietas oriundas de 35 trabalhos publicados nas décadas de 80 e 90 reportaram valores (g/d) para ingestão de N (467,3), N nas fezes (152,4), na urina (155,2), no leite (120,8) e retido (38,8). Esses valores representam respectivamente

32,6, 33,2, 25,9 e 8,5% do N ingerido. O valor de 38,8 g/d para retenção de N permitiria um ganho de 450 kg durante 305 dias de lactação (16% de PB/kg de ganho de peso vivo (PV)). Parece pouco provável que um balanço positivo dessa magnitude ocorra em vacas leiteiras.

Valores altos para a retenção de N (26 g/d) também foram reportados por Yan *et al.* (2006) e podem estar relacionados a erros de coleta, metodologia ou análise que subestime a quantidade de N nas fezes ou na urina, superestimando a retenção de N (SPANGHERO; KOWALSKI, 1997). Assumindo uma condição mais realista, considerando um ganho de PV diário de 137 g (50 kg em 365 d) equivaleria a uma retenção de 3,5 g/d de N (16% de PB/kg de ganho de PV). Esse valor representaria 0,7% do N ingerido considerando os dados de Spanghero e Kowalski (1997), representando muito pouco no balanço de N. Portanto, alguns autores têm assumido valor zero para a retenção de N, neste caso, N excretado (fezes + urina) = N ingerido – N no leite (NOUSIAINEN; SHINGFIELD; HUHTANEN, 2004) ou N urinário = N ingerido – (N nas fezes + N no leite) quando o N fecal é conhecido (HUHTANEN *et al.*, 2008).

Huhtanen e Hristov (2009) avaliaram dietas à base de forragens conservadas utilizadas na Europa (n = 938) e nos Estados Unidos (n = 736) e observaram valores para a EUN de 27,7 e 24,7% em relação N ingerido, respectivamente. Estes valores estão abaixo dos encontrados por Frank, Persson e Gustafsson (2002), que foram superiores a 40% do N ingerido para vacas com produção de 31 kg/d utilizando uma dieta com 14% PB na MS.

Segundo Tamminga (1992), o aumento da produção de leite pode aumentar a EUN devido ao efeito da diluição do N gasto na manutenção como proporção do N ingerido. Jonker, Kohn e High (2002) realizaram um levantamento com 454 produtores nos EUA e observaram que as fazendas de maior média de produção diária por vaca (30,8 vs 27,0 kg/d, $P < 0,01$) possuíam maior EUN (29,6 vs 27,7% do N ingerido, $P < 0,01$). Hristov, Price e Shafii (2004) fizeram uma análise descritiva de um banco de dados com 846 dietas e observaram que dietas com EUN > 30% do N ingerido apresentaram produção média de 35,2 kg/d, enquanto dietas com média de EUN de 24,7% do N ingerido tiveram produção média 31,9 kg/d de leite. Similarmente, Wilkerson, Glenn e McLeod (1997) utilizando um banco de dados oriundo de experimentos em gaiolas de metabolismo desde a década de 60, reportaram uma menor EUN para vacas produzindo 14 kg/d (n = 404) do que para vacas com produção de 29 kg/d (n = 560), os valores foram de 22 e 29,7% do N ingerido respectivamente.

Apesar de existir uma correlação positiva entre EUN e produção de leite, o coeficiente de determinação é baixo, $r^2 = 0,14$ (HUHTANEN *et al.*, 2008). Yan *et al.* (2006) estimaram que para cada 1 kg/d de aumento na produção de leite ocorre um aumento de 0,35 unidades

percentuais na EUN. Estes mesmos autores observaram uma relação inversa para os dias em lactação (DEL), em que para cada dia de aumento no DEL ocorreu uma redução de 0,034 unidades na EUN. Esse efeito do DEL pode estar relacionado à redução da produção de leite com o avançar da lactação e evidencia o baixo efeito da produção de leite sobre a EUN (HUHTANEN; HRISTOV, 2009) e que outros fatores, principalmente relacionados à dieta, podem ser mais determinantes da EUN.

A EUN em rebanhos leiteiros é normalmente baixa, valores inferiores a 30% do N são frequentemente encontrados (FADUL-PACHECO *et al.*, 2017; JONKER; KOHN; HIGH, 2002). Entretanto, existe uma variação considerável na EUN entre vacas e diferentes dietas o que demonstra potencial para melhorar a utilização do N (HUHTANEN *et al.*, 2015). O excesso de proteína na dieta é frequentemente a principal razão para a baixa EUN em rebanhos leiteiros (SPEK *et al.*, 2013).

2.2 Utilização do nitrogênio ureico no leite (NUL) como ferramenta para monitorar a partição do nitrogênio em vacas leiteiras

A proteína alimentar é degradada no rúmen em AA e peptídeos que podem ser incorporados diretamente na PMic ou serem deaminados liberando NH₃ também utilizada por alguns microorganismos como fonte de N para a síntese de PMic. A amônia produzida no rúmen e não incorporada na PMic é absorvida e convertida em ureia no fígado (PARKER *et al.*, 1995). No corpo os AA fornecidos além da exigência nutricional do animal, também são deaminados e convertidos em ureia (BRODERICK; CLAYTON, 1997).

A ureia tem difusão por todos os fluidos do corpo e a concentração de ureia no sangue foi altamente correlacionada com o NUL (BRODERICK; CLAYTON, 1997). Devido à sua aplicabilidade prática e facilidade de coleta e análise, o NUL tem sido utilizado como um indicador da emissão de NH₃ para o ambiente em fazendas leiteiras (BURGOS *et al.*, 2010). Powell, Wattiaux e Broderick (2011) avaliando vários rebanhos demonstraram que a redução do NUL de 14 para 10 mg/dL reduziu a emissão de NH₃ em até 34%. O aumento do NUL consistentemente aumenta a excreção de N na urina e a proporção do N urinário que é excretado como ureia (JONKER; KHON; ERDMAN, 1998; KAUFFMAN; ST-PIERRE, 2001).

A correlação entre o NUL e a EUN é alta e negativa ($r^2 = 0,626$) (BRODERICK; CLAYTON, 1997). Nousiainen, Shingfield e Huhtanen (2004) avaliaram um banco de dados com 306 tratamentos oriundos de 50 experimentos realizados na Finlândia e na Suécia e estimaram que para cada 1 mg/dL de aumento no NUL ocorreria uma redução de 0,73 pontos

percentuais na EUN. Este valor é superior ao observado por Huhtanen *et al.* (2015) de 0,16 pontos percentuais para cada 1 mg/dL de aumento no NUL.

2.3 Efeito do teor de proteína bruta da dieta sobre a partição do nitrogênio ingerido em vacas leiteiras

A manipulação do teor dietético de PB é uma estratégia eficiente para reduzir a excreção de N e aumentar a EUN (CASTILLO *et al.*, 2000; YAN *et al.*, 2006). A redução do teor de PB de 20 para 15% da MS pode reduzir a excreção de N em 21% nas fezes e até 66% na urina (CASTILLO *et al.*, 2000). Outros parâmetros dietéticos como a degradabilidade da proteína ou o teor de carboidrato não fibroso (CNF) também podem afetar a EUN, mas em menor magnitude quando comparado ao efeito do teor de proteína (HUHTANEN; HRISTOV, 2009). Entretanto, redução do teor de PB para níveis abaixo de 16% da MS, apesar do ganho em EUN, pode reduzir a produção de leite e a proteína no leite (BRODERICK; STEVENSON; PATTON, 2009; CABRITA *et al.*, 2011).

Broderick (2003) avaliou o efeito do teor de proteína da dieta em vacas da raça Holandês ($41,0 \pm 5,0$ kg/d) em meio da lactação ($DEL = 127 \pm 63$ d). As dietas a base de silagem de milho, silagem de alfafa, milho úmido e farelo de soja continham 15,1, 16,7 e 18,4% de PB na MS. Os teores proteicos foram obtidos com maior inclusão de farelo de soja em substituição ao milho úmido. A dieta com 15,1% de PB reduziu o CMS (1,2 kg/d) e a produção de leite (1,1 kg/d) e de proteína no leite (30 g/d) em relação às dietas com maior PB. Não houve benefício em desempenho com aumento da PB de 16,7 para 18,4% da MS da dieta. O NUL aumentou de forma linear 9,2, 12,4 e 15,9 mg/dL, coerente com o aumento na excreção de N na urina. Os valores de EUN para os tratamentos com 15,1, 16,7 e 18,4% de PB na MS foram de 30,3, 27,0 e 23,9% do N ingerido respectivamente.

Olmos Colmenero e Broderick (2006b) sugerem que o teor ideal de PB para maximizar a produção de leite e a proteína do leite é de 16 a 17% na MS para vacas em meio da lactação ($DEL = 120 \pm 76$) produzindo em torno de 37,1 kg/d de leite. O aumento da proteína da dieta para níveis acima de 17% da MS reduz a EUN sem ganho adicional em produção de leite ou proteína do leite (DINN; SHELFORD; FISHER, 1998; LEONARDI; STEVENSON; ARMENTANO, 2003), enquanto a redução do teor proteico para níveis abaixo de 16,0% da MS pode diminuir o CMS e reduzir o desempenho leiteiro (BRODERICK; STEVENSON; PATTON, 2009; CABRITA *et al.*, 2011).

Kalscheur *et al.* (1999) não observaram diferença no CMS quando alimentaram vacas no início da lactação (DEL = 63 d) com dietas com teor de PB de 17,4 ou 15,2% na MS. Neste caso, a redução do CMS não foi uma explicação para a menor produção de leite (37,6 vs 34,9, $P = 0,02$) e de proteína no leite (1,09 vs 0,98 kg/d, $P < 0,01$) observada para o tratamento com 15,2% de PB. A dieta de baixa proteína aumentou a EUN (28,1 vs 30,2 % do N ingerido, $P = 0,01$) mas com perda de desempenho leiteiro. Entretanto, Kalscheur *et al.* (2006) observaram um aumento na EUN (28,2 vs 30,4 % do N ingerido, $P < 0,05$) quando reduziram o teor de PB da dieta de 17,1 para 15,5% da MS e não observaram efeito sobre o CMS ou o desempenho leiteiro. Apesar da diferença no teor protéico, o fluxo de PM estimado pelo modelo do NRC (2001) não diferiu entre os tratamentos. Nesse caso, a similaridade em desempenho observada neste trabalho foi coerente considerando que o desempenho é determinado pela PM e não pelo teor de PB da dieta.

As diferenças nas respostas em desempenho e EUN provavelmente refletem as diferenças nas estratégias utilizadas para manipular o teor de PB em cada experimento. Neste caso, o fluxo de PM pode ser diferente para um mesmo teor de PB dependendo do CMS, da relação de proteína degradável no rúmen (PDR)/proteína não degradável no rúmen (PNDR) e da disponibilidade de energia da dieta. Como esses fatores variam entre experimentos, a definição de um teor ótimo de PB é improvável.

Dietas deficientes em PM, apesar de induzirem ganho em EUN, podem reduzir o desempenho leiteiro (LEE *et al.*, 2012b). Raggio *et al.* (2004) avaliaram três dietas utilizando o modelo do NRC (2001): 1) Baixa PM; 2) Média PM e 3) Alta PM. O fluxo de PM foi de 1922, 2264 e 2517 g/d para os respectivos tratamentos. A produção de leite e de proteína no leite foi reduzida e a EUN aumentou linearmente com a redução da PM.

Lee *et al.* (2011) em experimento contínuo de 10 semanas utilizaram 36 vacas em meio da lactação (DEL = 132 ± 7) com produção de leite de $44 \pm 9,6$ kg/d de leite. Foram utilizadas duas dietas: 1) Dieta adequada em PM com 16,7% de PB na MS, ou 2) Dieta deficiente em PM com 14,8% de PB. O balanço de PDR, PNDR e PM ajustados para o CMS obtido ao longo do experimento foi de 141, 56 e 44 g/d na dieta de alta PB e -42, -206 e -156 g/d na dieta de baixa PB de acordo com a predição do modelo do NRC (2001). A dieta deficiente em PM reduziu a produção de leite (39,3 vs 36,2 kg/d, $P < 0,05$) e reduziu numericamente o CMS (24,7 vs 23,8 kg/d, $P > 0,05$). A EUN foi maior para a dieta deficiente em PM (32,0 vs 27,6 % do N ingerido, $P = 0,001$).

Giallongo *et al.* (2016) utilizando vacas em meio da lactação (DEL = 115 ± 35) produzindo $40,3 \pm 6,7$ kg/d de leite também avaliaram o efeito de uma dieta deficiente em PM.

Neste trabalho, as dietas continham 16,5 ou 14,5% de PB na MS. O balanço de PM, ajustado para os dados de consumo e desempenho obtidos ao longo do experimento, foi de 243 e -56 kg/d para as dietas com 16,5 e 14,5% de PB respectivamente. O déficit de PM neste trabalho foi menor em relação ao reportado por Lee *et al.* (2011), mas teve o mesmo padrão de resposta. Houve uma tendência de aumento na EUN para a dieta deficiente em PM (26,4 vs 27,9% N ingerido, $P = 0,10$). Entretanto, houve redução no CMS (29,0 vs 27,7 kg/d, $P = 0,01$) e na produção de leite (42,5 vs 38,2 kg/d, $P < 0,01$) e de proteína no leite (1,27 vs 1,13 kg/d, $P < 0,01$).

O aumento da EUN observado para dietas deficientes em PM pode ser em parte explicado pela maior eficiência de uso da PM quando o consumo de proteína é baixo (DOEPEL *et al.*, 2004). Entretanto, o ganho em eficiência não é capaz de reverter a perda no desempenho leiteiro (RAGGIO *et al.*, 2004).

2.4 Disponibilidade de proteína para síntese de proteína microbiana no rúmen

O crescimento microbiano no rúmen depende da disponibilidade de energia e de fontes de N para a síntese de PMic. Já foi demonstrado que ruminantes são capazes de sintetizar proteína e obter desempenho produtivo a partir de dietas purificadas, livres de proteína verdadeira (VIRTANEN, 1966). Isso é possível devido à capacidade dos microorganismos ruminais de sintetizarem proteína de alto valor biológico a partir de amônia. Entretanto, estudos *in vitro* (GRISWOLD *et al.*, 1996; SOTO *et al.*, 1994) e *in vivo* (CHIKUNYA *et al.*, 1996) têm reportado efeito estimulatório de AA e peptídeos sobre a produção de PMic no rúmen.

A exigência dos microorganismos do rúmen por amônia ou peptídeos e AA pré-formados para a síntese proteica depende da espécie bacteriana (LING; ARMSTEAD, 1995) e da disponibilidade de energia (ARGYLE; BALDWIN, 1989). Russell *et al.* (1992) propuseram uma divisão dos microorganismos ruminais em dois grupos de acordo com a exigência de energia e proteína: 1) bactérias que degradam carboidratos fibrosos: têm baixa demanda de energia para manutenção, crescem lentamente e usam amônia como principal fonte de N, e 2) bactérias que degradam carboidrato não-fibrosos: têm alta demanda de energia para manutenção, alta taxa de crescimento e, além da amônia, também utilizam peptídeos e AA como fontes de N.

Chikunya *et al.* (1996) utilizaram quatro ovinos com cânula no rúmen em delineamento do tipo quadrado latino e com arranjo fatorial de tratamentos. Foram avaliadas dietas formuladas com feno ou polpa de beterraba e suplementadas com uréia ou caseína. A

suplementação com caseína dobrou a contagem de bactérias no fluido ruminal em relação à ureia na dieta com polpa de beterraba, mas não houve diferença no crescimento microbiano quando a dieta foi à base de feno. O fluxo de PMic avaliado pela excreção diária de alantoína teve o mesmo comportamento. Soto *et al.* (1994) infundiram solução salina, ureia, AA ou peptídeos no rúmen de ovinos recebendo somente feno de baixa digestibilidade e não observaram efeito dos tratamentos sobre o fluxo de PMic ou digestibilidade de nutrientes.

Para dietas não limitantes em energia, o crescimento microbiano é determinado pela disponibilidade ruminal de amônia, peptídeos e AA (BOUCHER *et al.*, 2007; REYNAL; BRODERICK, 2005). A definição da concentração ideal de amônia no fluido ruminal para maximizar a síntese de PMic tem sido objeto de pesquisa. Satter e Slyter (1974) demonstraram *in vitro* que uma concentração mínima de 5 mg/dL de NH₃ no fluido ruminal foi requerida para manter o crescimento microbiano. Este valor é similar ao obtido por Russel e Strobel (1987) utilizando cultura mista também *in vitro*, mas inferior a 8,5 mg/dL observado *in vivo* por Kang-Meznarich e Broderick (1980). Além da técnica utilizada, outros fatores podem interferir no valor atribuído ao requerimento de concentração de amônia para crescimento microbiano obtido em cada experimento. Por exemplo, Balcells *et al.* (1993) observaram que a degradação *in situ* da palha de trigo foi reduzida em concentrações de amônia inferiores a 5 mg/dL, entretanto, uma concentração de 11,0 mg/dL foi necessária para maximizar o crescimento microbiano.

Olmos Colmenero e Broderick (2006b) avaliaram teores crescentes de PDR (9,3, 10,2, 11,0, 11,9 e 12,7% da MS) e observaram concentração média de NH₃ no rúmen de 6,1, 7,7, 9,2, 12,7 e 12,8 mg/dL. Entretanto, nos tratamentos com 9,3 e 10,2% de PDR a concentração de NH₃ no rúmen foi de 3,0 e 3,7 mg/dL por um período de pelo menos 12 h ao longo do dia, mas foi sempre superior a 10 mg/dL ao longo das 24 h para os demais tratamentos. A excreção diária de alantoína aumentou de forma linear com o incremento na PDR, mas sem diferença numérica a partir de 11% da MS. Houve redução na digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) para o teor de PDR de 9,3%. Entretanto, Cunningham *et al.* (1996) avaliaram dietas com 9,2, 9,7 e 10,9% de PDR na MS e não observaram diferença no fluxo de PMic ou na digestibilidade da FDN. A concentração média de NH₃ no rúmen foi de 5,3, 7,9, 8,9 mg/dL respectivamente.

Reynal e Broderick (2005) avaliaram o efeito do teor de PDR da dieta sobre o desempenho leiteiro e o fluxo de PMic para o omaso. As dietas continham 7,7, 9,2, 10,9 e 12,5% de PDR na MS pelas estimativas do NRC (2001). A manipulação do teor dietético de PDR foi obtida pela substituição de farelo de soja e ureia por farelo de soja de baixa degradabilidade ruminal (tratado com lignosulfonato). O fluxo de PMic para o omaso foi maior no tratamento com 12,5% de PDR, intermediário para os teores de 10,9 e 9,2%, e menor na dieta com 7,7%

de PDR na MS. Não houve efeito do teor de PDR sobre a degradabilidade de nutrientes no rúmen. A concentração ruminal de NH_3 aumentou linearmente com o teor de PDR e foi 5,7, 8,7, 11,8 e 12,3 mg/dL. A eficiência de síntese da PMic também aumentou de forma linear com a maior disponibilidade de proteína no rúmen.

Boucher *et al.* (2007) suplementaram 0, 0,3, 0,6 e 0,9 % de ureia na MS da dieta aumentando o teor de PDR de 9,2 para 10,0, 10,8 e 11,6% da MS. A concentração ruminal de amônia foi 9,0, 11,9, 12,8 e 17,4 mg/dL para os respectivos teores de ureia. O fluxo de PMic e a eficiência de síntese de PMic apresentaram um comportamento quadrático, aumentaram até o nível de suplementação de 0,6% e diminuíram quando a suplementação foi de 0,9% de ureia.

Além da amônia, a disponibilidade de peptídeos e AA pode afetar o crescimento microbiano no rúmen (JONES; HOOVER; WEBSTER, 1998). Brito *et al.* (2007) forneceram quatro dietas variando a fonte de N da PDR. Os tratamentos foram ureia, farelo de canola, farelo de soja e farelo de algodão. As dietas foram isoproteicas e continham 16,5% de PB na MS. O teor de PDR (% da MS) foi de 13,1 para ureia, 11,0 para o farelo de soja, 10,7 para o farelo de algodão e 11,5 para o farelo de canola. A dieta com ureia deprimiu a síntese de PMic e a eficiência de síntese de PMic comparativamente às fontes com proteína verdadeira. Em estudo *in vitro* Jones, Hoover e Webster, (1998) demonstraram que um mínimo de 7,6% de PDR na MS oriundo de proteína verdadeira foi necessário para não deprimir o crescimento microbiano.

Broderick e Reynal (2009) avaliaram dietas similares em teor de PB, PDR e PNDR, 16,0, 10,5 e 5,5% da MS, respectivamente, mas que diferiram na proporção da PDR oriunda de uréia e proteína verdadeira. A inclusão de uréia foi de 0, 0,4, 0,8 e 1,3% da MS correspondente a 0, 1,2, 2,4 e 3,7% de PDR na MS. Os teores dietéticos foram obtidos pela substituição do farelo de soja por uma combinação de uréia e farelo de soja de baixa degradabilidade ruminal (tratado com lingsulfonato). A concentração de amônia no rúmen aumentou de forma linear e foi 8,2, 9,3, 10,3 e 10,7 mg/dL. Entretanto, o fluxo de PMic e a eficiência de síntese de PMic foram reduzidos com a maior proporção de ureia na dieta. A conclusão dos autores foi que a substituição do farelo de soja por ureia pode ter limitado a disponibilidade de AA e peptídeos para o crescimento microbiano.

Argyle e Baldwin (1989) num trabalho clássico avaliaram o efeito de amônia, peptídeos e AA sobre o crescimento microbiano *in vitro*. Os AA foram avaliados em grupos: básicos (Lisina, Arginina, Glutamina, Asparagina), doadores de N (Aspartato, Asparagina, Glutamato, Glutamina), aromáticos (tirosina, Triptofano, fenilalanina, histidina), neutros (treonina, serina, prolina, glicina, alanina), sulfurados (metionina e cisteína) e ramificados (isoleucina, leucina e valina). As fontes de peptídeos foram dois hidrolisados de caseína e caseína pura. O crescimento

microbiano não foi afetado por nenhum dos grupos quando adicionados isoladamente, mas a adição da mistura de todos os grupos aumentou o crescimento microbiano em relação ao tratamento contendo somente amônia. A adição de peptídeos consistentemente aumentou o crescimento microbiano em relação à amônia. A mistura de todos os AA teve uma ação sinérgica sobre o crescimento microbiano quando a fonte de peptídeo foi a caseína e esse efeito foi independente do grupo de aminoácido avaliado.

Kajikawa, Mitsumori e Ohmomo (2002) avaliaram o efeito da substituição de 25% de N na forma de amônia por N oriundo de uma mistura dos vinte AA ou pela inclusão de cada aminoácido a um meio de cultura contendo glicose, xilose e celobiose. A mistura dos vinte AA aumentou em 46% a taxa de crescimento e em 15% a eficiência de síntese microbiana (g de bactéria/g de açúcar). Os AA adicionados individualmente não aumentaram o crescimento microbiano, exceto glutamato e glutamina que aumentaram em 12% a taxa de crescimento microbiano. Entretanto, leucina, fenilalanina, valina, triptofano, tirosina, glutamato e metionina quando retirados individualmente da mistura diminuíram a magnitude da resposta obtida com os vinte AA. Neste caso, o efeito estimulatório de um aminoácido foi dependente da presença de outros AA. Contrariamente, os AA isoleucina, treonina, fenilalanina, cisteína, leucina, lisina e valina inibiram o crescimento microbiano quando substituíram a amônia, indicando que um mesmo aminoácido pode ter efeito inibitório ou estimulatório sobre o crescimento microbiano.

O mecanismo proposto para o efeito negativo de um AA no crescimento microbiano foi a limitação da síntese de outros AA que compartilham a mesma rota metabólica do AA inibitório. Neste caso, ocorreria um feedback negativo do AA inibitório sobre enzimas da etapa inicial da rota de síntese (FELICE *et al.*, 1979). A suplementação do AA inibido poderia reverter o efeito negativo de sua ausência sobre o crescimento microbiano (KAJIKAWA; MITSUMORI; OHMOMO, 2002). Entretanto, a suplementação com metionina, que é sintetizada por rota comum à da treonina, não foi capaz de reverter o efeito negativo deste último sobre o crescimento microbiano *in vitro* (KAJIKAWA *et al.*, 2005).

Gil, Shirley e Moore (1973) relataram aumento do crescimento microbiano *in vitro* quando DL-metionina foi adicionada a um meio contendo celulose ou amido como substrato energético e somente amônia como fonte de N. A digestibilidade tanto da celulose quanto do amido foi aumentada pela adição de DL-metionina. Houve aumento da massa microbiana após 24 e 48 h de fermentação para a celulose e após 9 e 18 h para o amido. O efeito positivo da DL-metionina sobre a digestibilidade de nutrientes e o crescimento microbiano não foi observado quando a dieta basal utilizada no fermentador continha teores de 15 a 16,5% de PB na MS oriundo de proteína verdadeira (NOFTSGER *et al.*, 2003; WINDSCHITL; STERN, 1988).

Bull e Vandersall (1973) alimentaram oito garrotes com silagem de milho e um concentrado a base de milho moído e ureia. Os tratamentos foram controle e DL-metionina (0,21% da MS da dieta). Não foi observado efeito na digestibilidade da MS ou da fibra em detergente ácido (FDA) com a suplementação de DL-metionina. Noftsker, St-Pierre e Sylvester (2005) também in vivo avaliaram a suplementação de DL-metionina utilizando oito vacas canuladas. A dieta basal continha 18% de PB e era composta por 43% de forragem a base de silagem de milho e alfafa e 57% de concentrado com milho e farelo de soja e foi suplementada com 0,08% de DL-metionina na MS. A recuperação de DL-metionina no omaso foi similar ao controle, sugerindo que 100% foi degradada no rúmen. A suplementação com metionina aumentou a degradabilidade da FDN no rúmen (37,2 vs 40,8 % da FDN, $P < 0,001$) mas não houve efeito sobre o fluxo de PMic.

As bactérias fibrolíticas também podem se beneficiar do suprimento de AA no rúmen (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Griswold *et al.* (2003) utilizaram quatro dietas com diferença no teor de PDR (alta = 11 ou baixa = 8% da MS) oriunda de proteína verdadeira adicionadas ou não de ureia: Alta, Alta + Ureia, Baixa, Baixa + Ureia. Houve uma interação entre o teor de PDR e a suplementação de ureia para a digestibilidade da hemicelulose, da FDN e da pectina. A adição de ureia aumentou a digestibilidade somente em disponibilidade de PDR. A digestibilidade da FDA aumentou para as dietas com ureia. A diferença da resposta em digestibilidade para hemicelulose e FDN em relação à FDA sugere que bactérias hemicelulolíticas utilizaram peptídeos enquanto bactérias celulolíticas utilizaram principalmente amônia.

Entretanto, Atasoglu, Newbold e Wallace (2001) utilizando fermentadores in vitro demonstraram que bactérias celulolíticas como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* e *Ruminococcus albus* reduziram a incorporação de N oriundo de amônia em 90% quando peptídeos (hidrolisado de caseína) foram adicionados e em 60% com a adição de AA.

Martin *et al.* (2013) quantificaram bactérias celulolíticas em seis vacas secas com cânula no rúmen. A dieta basal composta por feno de gramínea e trigo grão continha 15,5% de PB na MS e foi suplementada com os precursores de metionina HMB ou HMBi. A densidade de *Fibrobacter succinogenes* e *Ruminococcus flavefaciens* aumentou com a adição de HMB ou HMBi em relação à dieta controle. Entretanto, não houve um efeito na degradação in situ de uma amostra de silagem de milho e milho moído ou sobre a atividade das enzimas fibrolíticas endoglucanase e xilanase. Similarmente, a suplementação de metionina na forma de Smartamine M (Adisseo NA, Alpharetta, GA) aumentou a densidade de *Fibrobacter succinogenes* em vacas secas recebendo uma dieta com 65% de forragem e 14,2% de PB na

MS (ABDELMEGEID *et al.*, 2018). Entretanto, em estudos in vivo a suplementação com RPM não apresenta ganhos em digestibilidade da fibra (BRODERICK *et al.*, 2008; BRODERICK; STEVENSON; PATTON, 2009; CHEN *et al.*, 2011).

O mecanismo pelo qual AA e peptídeos estimulam o crescimento microbiano não é claro. A possibilidade de incorporação direta de AA na proteína microbiana ou sua utilização para síntese de outro AA parece ser plausível (BACH; CALSAMIGLIA; STERN, 2005). Por exemplo, Cotta e Russell (1982) demonstraram que o crescimento in vitro de *Fibrobacter succinogenes* foi muito dependente da disponibilidade de cisteína. A cisteína, assim como outros AA, pode ser derivado do metabolismo de metionina.

Apesar do teor de PDR ser importante como fonte de amônia, peptídeos e AA para o crescimento microbiano, o modelo do NRC (2001) não faz uma distinção entre fontes de N para o cálculo da estimativa de síntese de PMic. Já a estimativa de fluxo de PMic obtida pelo modelo do CNCPS pode ter um incremento de até 17% quando o requerimento de peptídeo é totalmente suprido pela dieta (SNIFFEN *et al.*, 1992). O fluxo de peptídeos é estimado pela extensão da fração B da proteína que é degradada no rúmen e a exigência é calculada assumindo que até 66% do N incorporado na proteína sintetizada por bactérias digestoras de CNF é oriundo de peptídeos e AA que são utilizados com 80% de eficiência (RUSSELL; SNIFFEN; VAN SOEST, 1983; SNIFFEN *et al.*, 1992).

O NRC (2001) fez um estudo de regressão utilizando um banco de dados com 38 trabalhos e 206 tratamentos e concluíram que o teor de PDR de 12,2% na MS da dieta foi necessário para maximizar a produção de leite e proteína no leite. Entretanto, a exigência nutricional de PDR para o mesmo banco de dados pela estimativa do modelo foi 10,2% de PDR na MS. Similarmente, Reynal e Broderick (2005) observaram um efeito quadrático para o teor de PDR da dieta e demonstraram que 10,9% da MS foi necessário para maximizar a síntese de proteína do leite. Entretanto, o fornecimento de dietas com PDR abaixo desses valores recomendados não resultou em perda de desempenho em alguns trabalhos. Reynal e Broderick (2005) observaram que apesar da redução na síntese de PMic com a menor inclusão de PDR, a produção de proteína no leite diminuiu somente quando o teor foi reduzido de 9,2 para 7,7% da MS da dieta.

Cyriac *et al.* (2008) avaliaram teores decrescentes de PDR na dieta 11,2, 10,0, 8,7, 7,6% da MS substituindo farelo de soja por farelo de soja de baixa degradabilidade no rúmen (Hivap, Purina Feed, Statesville, NC). Houve redução no CMS, na produção de leite e de proteína no leite quando o teor de PDR foi reduzido para 7,6% da MS. Resultado similar foi observado por Barros *et al.* (2017) quando reduziram o teor de PDR de 9,2 para 8,4% da MS da dieta.

2.5 Proteína não-degradável no rúmen e eficiência de uso do nitrogênio em vacas leiteiras

Olmos Colmenero e Broderick (2006a) avaliaram dietas com 16,6 e 15,6% de PB na MS. A redução de PB foi obtida pela substituição do farelo de soja por farelo de soja de baixa degradabilidade no rúmen (“Expeller soybean meal”). Os teores de PDR e PNDR foram 10,5 e 5,1% para a dieta de baixa e 11,7 e 4,8% para a dieta de alta proteína. O CMS não foi afetado e houve uma tendência para menor produção de leite (38,8 vs 40,0 kg/d, $P = 0,08$) e de proteína no leite (1,21 vs 1,26 kg/d, $P = 0,11$) para a dieta com menor PB e farelo de soja de baixa degradabilidade ruminal. O NUL foi menor para a dieta com baixa PB (8,9 vs 9,8 mg/dL, $P < 0,01$), mas não houve efeito para a EUN, que foi numericamente superior para a dieta de baixa proteína (30,1 vs 29,3% do N ingerido, $P = 0,27$). Apesar da menor ingestão de N na dieta de baixa PB, houve uma redução numérica na produção de proteína no leite minimizando o ganho em EUN. Nesse trabalho o efeito da degradabilidade proteica pode ser confundido com a redução simultânea do teor de PB.

Broderick, Stevenson e Patton (2009) avaliaram a substituição de farelo de soja por farelo de soja de baixa degradabilidade no rúmen (tratado com lignosulfonato) em dietas diferindo no teor de PB. Os tratamentos foram: 15,8% de PB com 5,3 ou 6,0% de PNDR e 17,1% de PB com 6,0 ou 6,6% de PNDR na MS da dieta. Não houve interação entre o teor dietético de PB e a PNDR. A dieta com 15,8% de PB reduziu o CMS e a produção de leite e de proteína no leite, mas aumentou a EUN em relação à dieta com 17,1% de PB. O teor de PNDR das dietas não afetou o desempenho ou a EUN. Resultado similar foi observado por Mutsvangwa *et al.* (2016) quando forneceram dietas com 14,9% de PB (4,5 ou 5,2% de PNDR) ou 17,5% de PB (5,6 ou 6,8% de PNDR) com base na MS da dieta.

Martins *et al.* (2019) avaliaram o aumento da PNDR em dietas com 15,9% de PB na MS. Foram avaliados os teores de PDR e PNDR de 10,7 e 5,2 ou 9,5 e 6,4% respectivamente. O aumento da proporção de PNDR aumentou o teor (+ 0,03 pontos percentuais) e a síntese de proteína do leite (+ 40 g/d), mas não houve efeito sobre o NUL. Apesar da tendência de aumento (577 vs 581 g/d, $P = 0,10$) na ingestão de N para o tratamento com alta PNDR, a EUN foi ligeiramente superior (29,5 vs 30,6% do N ingerido, $P = 0,02$) devido ao aumento da síntese de proteína e da secreção de N no leite.

A suplementação de PNDR tem mostrado resultado variável ou respostas de baixa magnitude em produção de leite e de proteína no leite (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2005a; SANTOS *et al.*, 1998). Apesar do aumento do fluxo de PNDR, o fluxo de PMic pode ser

reduzido devido ao menor teor de PDR, resultando em fluxo de PM similar (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; REYNAL; BRODERICK, 2005) ou ligeiramente superior à dieta controle (IPHARRAGUERRE; CLARK, 2005a), o que é coerente com a variabilidade na resposta em desempenho. Considerando a similaridade no CMS e na ingestão diária de N (SANTOS *et al.*, 1998), bem como a falta de resposta em produção de proteína no leite (CUNNINGHAM *et al.*, 1996; MUTSVANGWA *et al.*, 2016), parece pouco provável que a suplementação de PNDR tenha impacto significativo sobre a EUN.

2.6 Aminoácidos limitantes do desempenho leiteiro

A infusão de caseína no abomaso (CLARK *et al.*, 1977) ou de AA no duodeno (RULQUIN, 1987; SCHWAB; SATTER; CLAY, 1976) aumenta a produção de leite, a produção e o teor de proteína no leite e a EUN (ROGERS *et al.*, 1984; SCHWAB *et al.*, 1992). Para a mesma ingestão diária de N, a EUN aumentou em até 12% para vacas que receberam infusão de caseína (DERRIG; CLARK; DAVIS, 1974; SPIRES *et al.*, 1975). Mesmo quando a infusão de caseína aumentou a ingestão de N em 13%, supostamente capaz de reduzir a EUN (CASTILLO *et al.*, 2000), a síntese de proteína no leite aumentou em 12% e a EUN foi similar entre os tratamentos (CLARK *et al.*, 1977).

O ganho em EUN observado em estudos com infusão de caseína demonstra que o suprimento adequado de AA é uma oportunidade para manipular a EUN em vacas leiteiras sem induzir a perda de desempenho leiteiro. A utilização de caseína é impraticável sob muitos aspectos e a suplementação de todos os AA essenciais também não é possível por vários motivos, inclusive viabilidade econômica. A resposta produtiva ao suprimento de AA depende do quanto a dieta basal é deficiente em AA proporcionalmente ao requerido pela glândula mamária para a síntese de leite e ou proteína no leite (CLARK, 1975). Neste caso, a definição de quais os AA são limitantes para o desempenho leiteiro é importante para definir a estratégia de suplementação de vacas leiteiras.

Os AA metionina e lisina foram reportados como os principais limitantes da produção de leite em experimentos utilizando infusão de caseína (CLARK *et al.*, 1977; SPIRES *et al.*, 1975). Nestes experimentos, os AA essenciais foram ordenados de acordo com a proporção em que são utilizados pela glândula mamária para síntese de proteína no leite a partir da concentração plasmática arterial. Por este método “eficiência de transferência” assume-se que o AA proporcionalmente mais utilizado seria o mais limitante.

Um grupo de pesquisadores utilizaram o método da “eficiência de transferência” para ordenamento dos AA em ensaios de desempenho com vacas entre 4 a 16 semanas pós-parto. A dieta basal continha 15,3% de PB na MS e foi suplementada com 15 g/d de DL-metionina. A suplementação com metionina aumentou a produção de leite, o teor e a produção de proteína no leite (ILLG; SOMMERFELDT; SCHINGOETHE, 1987; SCHINGOETHE *et al.*, 1988). A metionina foi o primeiro e a lisina o segundo AA mais limitante (ILLG; SOMMERFELDT; SCHINGOETHE, 1987). A definição de AA limitante por meio da “eficiência de transferência” utiliza a concentração no sangue arterial para o cálculo. Entretanto, concentração plasmática reflete o equilíbrio entre a absorção intestinal, a síntese endógena e a utilização de AA, o que torna difícil a interpretação do teor plasmático para identificar os mais limitantes (CLARK, 1975). O ordenamento dos AA essenciais mais limitantes por esta metodologia mostrou diferentes resultados: lisina e fenilalanina (VIK-MO *et al.*, 1974), treonina, fenilalanina e metionina (DERRIG; CLARK; DAVIS, 1974), e lisina, metionina, fenilalanina e histidina (CLARK *et al.*, 1977).

Schwab, Satter e Clay (1976) fizeram uma sequência de experimentos de dose-resposta para avaliar de forma direta a sequência de AA limitantes. Foram utilizadas infusões abomasais de metionina, lisina, metionina + lisina e metionina + lisina + outros grupos de AA essenciais. A dieta basal continha 11% de PB na MS e era composta por silagem de milho, feno de gramínea e um concentrado energético a base de milho laminado. Os tratamentos, isoproteicos e isoenergéticos, foram comparados a um controle negativo (deficiente) e a um controle positivo (balanceado) em relação aos AA essenciais. O controle positivo foi a caseína ou uma mistura dos 10 AA essenciais na mesma proporção da proteína do leite. A resposta em teor de proteína do leite foi de maior magnitude e mostrou-se a mais sensível à variação do perfil de AA infundido. A resposta obtida para o controle positivo em relação ao controle negativo foi definida como 100%. Os tratamentos foram avaliados em relação ao quanto foram capazes de elicitar uma resposta da mesma magnitude da obtida pelo controle positivo. Por este parâmetro a infusão individual de L-metionina (7,1 g/d) representou -15% e a de L-lisina (22,1 g/d) 16% da resposta em teor de proteína do leite observada para o controle positivo. A infusão conjunta lisina + metionina aumentou a resposta para 43% e a adição de outros AA (lisina + metionina + outros) resultou em 63% da resposta para o controle positivo.

Rulquin (1987) avaliou a infusão duodenal de lisina (30 g/d) e metionina (11 g/d) separadamente ou em conjunto. Foram utilizadas quatro vacas em início da lactação (DEL = 70 d) em delineamento do tipo quadrado latino (QL) com períodos de 15 dias. A dieta basal continha silagem de milho, feno de gramínea e concentrado. O teor de PB, 14% da MS com

26% oriundo de milho, foi ajustado para atender 80% da demanda de proteína. A lisina e a metionina infundidas isoladamente não tiveram efeito, mas em conjunto aumentaram significativamente a produção de proteína do leite em relação à dieta controle. Este resultado foi similar ao observado por Schwab, Satter e Clay (1976), em que a infusão conjunta também resultou em resposta superior à infusão individual demonstrando que em algumas situações uma co-limitação pode ocorrer para estes AA.

A lisina parece ser o primeiro aminoácido limitante para vacas em início da lactação quando a dieta é restrita em proteína ou quando mais de 43% da proteína alimentar é oriunda do milho (SCHWAB *et al.*, 1992; SCHWAB; SATTER; CLAY, 1976). Polan *et al.* (1991) demonstraram que a lisina foi o primeiro aminoácido limitante quando o farelo de glúten de milho substituiu o farelo de soja em dietas com 16% de PB na MS. Entretanto, para uma ampla variedade de dietas tradicionalmente utilizadas para vacas leiteiras de alta produção e com teor dietético de PB acima de 16% na MS, não houve evidência de que a lisina foi um aminoácido limitante (LEAN *et al.*, 2018; PATTON, 2010). Nestas dietas, majoritariamente à base de silagem de milho, alfafa, milho moído e proteína oriunda de soja ou farinhas de origem animal, a metionina parece ser o primeiro aminoácido limitante para a produção de leite e proteína do leite (ARMENTANO; BERTICS; DUCHARME, 1997; CASPER *et al.*, 1987; YANG; SCHINGOETHE; CASPER, 1986).

A definição de AA limitante depende do tipo de forragem (RULQUIN; LE HENAFF; VÉRITÉ, 1990), do teor e da fonte de proteína da dieta (POLAN *et al.*, 1991) e do estágio de lactação das vacas (POLAN *et al.*, 1991; SCHWAB *et al.*, 1992). Ainda assim, o limite que define o quanto um AA ou outro restringe o desempenho nem sempre é muito claro, existindo frequentemente uma zona de co-limitação na qual a suplementação de um AA individualmente pode não ser suficiente para uma resposta positiva (MUNNEKE; SCHINGOETHE; CASPER, 1991). Outros AA além da lisina e da metionina podem ser limitantes, como histidina em dietas deficientes em PM (GIALLONGO *et al.*, 2015; LEE *et al.*, 2012b) e leucina, triptofano e treonina foram sugeridos como potenciais limitantes (LEAN *et al.*, 2018).

O National Research Council (NRC, 2001) definiu parâmetros para a formulação de dietas para lisina e metionina assumindo que estes AA são os principais limitantes para a síntese de proteína no leite. Utilizando um modelo de dose-resposta foi definida a proporção ideal de lisina e metionina na PM para maximizar o teor e a produção de proteína no leite. O valor de metionina para maximizar o teor de proteína do leite foi de 2,4% da PM desde que o valor mínimo de lisina da dieta seja 6,5% na PM. Já para a lisina maximizar o teor de proteína do leite o valor foi de 7,20% da PM desde que o valor mínimo de metionina da dieta seja 1,95%

da PM. O modelo baseado na produção de proteína mostrou resultados similares, mas as equações apresentaram baixo coeficiente de determinação. Schwab, Ordway e Whitehouse (2004) propuseram uma recomendação para uso prático de 2,2 e 6,6% da PM para metionina e lisina. Por esta metodologia assume-se que a resposta é linear e independente do fluxo de PM até atingir o valor máximo.

2.7 Métodos de proteção de aminoácidos da degradação ruminal

Apesar de fundamentais para estudar a resposta de vacas leiteiras ao aumento da disponibilidade pós-ruminal de AA, métodos de infusão não são práticos para serem implementados como rotina em fazendas leiteiras. Além disso, a caseína ou AA fornecidos diretamente no rúmen são rapidamente hidrolisados e deaminados. Neste caso, métodos de proteção da degradação no rúmen são requeridos para viabilizar o fornecimento de AA para ruminantes através da dieta.

O encapsulamento de AA é uma tecnologia antiga, Broderick, Kowalczyk e Satter (1970) avaliaram um produto experimental encapsulado constituído de um núcleo coloidal de metionina e caulim recoberto por filme contínuo de tristearina. A composição foi de 20% de DL-metionina, 20% de caulim e 60% de tristearina. A forma final do produto são pequenos grânulos de 300 a 1000 μm de diâmetro. Em ensaio com ratos o produto manteve crescimento similar ao obtido com DL-metionina cristalizada. No experimento com vacas em lactação foram testadas as doses de 5, 15 e 45 g/d de DL-metionina. Não houve efeito das doses testadas em relação à dieta controle para produção de leite, teor ou produção de sólidos. Entretanto, a concentração plasmática de metionina aumentou para a dose de 15 g/d sugerindo que parte do produto escapou da degradação ruminal e foi absorvido no intestino.

Neudoerffer, Duncan e Horney (1971) fizeram uma sequência de experimentos *in vitro* e *in vivo* utilizando o mesmo produto experimental utilizado por Broderick, Kowalczyk e Satter (1970). Em torno de 30% da metionina foi degradada no rúmen, 5 a 10% ficou retida na cápsula e provavelmente foi eliminada nas fezes e cerca de 60 a 65% foi disponível para absorção no intestino. Chalupa (1975) fez uma revisão dos métodos de encapsulamento de DL-metionina e descreveu um produto experimental similar composto de uma combinação de tristearina e ácido graxo insaturado, sendo 15% de ácido oleico, 55% de tristearina, 20% de metionina e 10% de carbonato de cálcio. Nesta formulação em torno de 80% da metionina ficou disponível para a absorção intestinal. Outros materiais utilizados para proteção também foram descritos nesta

revisão, como polímeros básicos de amino acrilatos ou metacrilatos, propionato de celulose-3-morfolino butirato e polímeros de imidamina.

Um produto encapsulado foi avaliado em uma série de experimentos realizados por pesquisadores de Dakota do Sul com vacas em início da lactação. O produto continha 58% de uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados, 6% de carbonato de cálcio e 30% de DL-metionina (Ketionin - Rumen Kjemi S/A, Oslo, Noruega). A suplementação de 15 g/d de DL-metionina aumentou a concentração plasmática de metionina quando não houve incremento da produção ou do teor de proteína do leite (MUNNEKE; SCHINGOETHE; CASPER, 1991). Entretanto, quando a metionina disponível foi utilizada para a síntese de proteína sua concentração plasmática não foi alterada (ILLG; SOMMERFELDT; SCHINGOETHE, 1987). Considerando que aumento na concentração plasmática de AA ocorre quando o suprimento do AA é maior que a utilização pelos tecidos (CLARK, 1975), pode-se inferir que o encapsulamento foi efetivo em disponibilizar metionina no intestino.

Um dos principais produtos disponíveis no mercado como fonte suplementar de DL-metionina é o Smartamine-M (Adisseo, França). O mecanismo de proteção é uma barreira física de gordura que protege da degradação ruminal, mas é sensível ao baixo pH do abomaso o suficiente para liberar a metionina no intestino. O produto contém 74% de DL-metionina e a biodisponibilidade informada pelo fabricante é de 80%, este valor foi confirmado em diversos experimentos utilizando diferentes métodos de avaliação (GRAULET; RICHARD; ROBERT, 2005; RULQUIN; KOWALCZYK, 2003). Outro produto disponível no mercado é o Mepron-85 (Evonik, Alemanha) que também utiliza o conceito de encapsulamento, mas a barreira física é um polímero de etil celulose. O conteúdo de DL-metionina é de 85% e a biodisponibilidade informada pelo fabricante é de 80%, também confirmada experimentalmente (OVERTON *et al.*, 1996). Esses produtos foram amplamente testados pela pesquisa em ensaios de desempenho e uma análise dos resultados obtidos para os dois produtos foi sumarizada por Patton (2010).

O encapsulamento é efetivo para a proteção da degradação ruminal e posterior liberação do AA no intestino. Além da estrutura química de proteção, a forma física final do produto pode interferir na disponibilidade intestinal, uma granulometria acima de 100 µm de diâmetro parece desejável para boa solubilidade do produto no intestino (NEUDOERFFER; DUNCAN; HORNEY, 1971).

O HMB, ácido 2-hidróxi-4-(metiltio)-butanóico, é um precursor que é convertido em metionina por vários tecidos, mas principalmente no fígado e nos rins (LOBLEY *et al.*, 2006). Entretanto, em ruminantes o HMB tem baixa biodisponibilidade, evidenciada pela alta taxa de degradação no rúmen, acima de 90% (JONES *et al.*, 1988), e pela falta de resposta em teor e

produção de proteína do leite (LUNDQUIST; OTTERBY; LINN, 1985), que é típica para a suplementação com metionina (LEAN *et al.*, 2018). Além disso, a suplementação de HMB frequentemente aumenta a produção e o teor de gordura do leite por possível efeito no metabolismo microbiano (LUNDQUIST; OTTERBY; LINN, 1985; ST-PIERRE; SYLVESTER, 2005), que também reflete a alta degradabilidade da molécula no rúmen.

A esterificação do HMB com isopropanol resulta em HMBi (ácido isopropílico 2-hidróxi-4-(metiltio)-metil butanóico. O HMBi possui maior estabilidade no rúmen e quando absorvido é rapidamente convertido em HMB (GRAULET; RICHARD; ROBERT, 2005). Um produto disponível no mercado, MetaSmart (Adisseo, França) contém 90% de HMBi equivalente a 70% de DL-Metionina (1 mol HMBi = 0,78 mol DL-Metionina) com 50% de biodisponibilidade. A eficiência do HMBi tem sido demonstrada em experimentos com respostas similares ao AA fornecido na forma encapsulada (CHEN *et al.*, 2011; RULQUIN *et al.*, 2006).

O fornecimento de HMBi ou DL-metionina encapsulada são estratégias efetivas para aumentar o suprimento de metionina no sangue. Variações na resposta podem ocorrer devido ao tipo de produto utilizado (CHALUPA, 1975), o que requer validação *in vivo* da biodisponibilidade e do desempenho para comprovar a eficácia de cada produto (FLEMING *et al.*, 2019).

2.8 Resposta de vacas leiteiras à suplementação com metionina protegida da degradação ruminal

A redução no teor de proteína da dieta é uma estratégia para reduzir a excreção urinária de N e aumentar a EUN (HUHTANEN; HRISTOV, 2009). Entretanto, apesar do ganho em EUN, dietas de baixa proteína podem reduzir a produção de leite e proteína no leite devido ao balanço negativo de PM (GIALLONGO *et al.*, 2016). Lee *et al.* (2011) observaram que o balanço de PM foi negativo (- 156 g/d) quando forneceram dietas com 14,8% de PB. Essa dieta resultou em menor produção de leite e proteína do leite comparado à dieta com 16,7% de PB e balanço positivo de PM (+ 44 g/d). Dietas com PB em torno de 16,5% da MS foram adequadas para vacas em meio da lactação (DEL = 120 d) com produção de 33 a 38 kg/d de leite (BRODERICK, 2003; OLMOS COLMENERO; BRODERICK, 2006a).

Chen *et al.* (2011) avaliaram a suplementação de RPM (SmartamineM- Adisseo, Alpharetta, GA) em dietas com teores de PB abaixo dos recomendados por Broderick (2003). Foram utilizadas 70 vacas ($42,6 \pm 5,1$ kg/d de leite e 147 ± 53 DEL) em delineamento contínuo

por 14 semanas. Foram formuladas 4 dietas: 1) Controle negativo com 15,6% de PB na MS sem metionina, 2) 15,6% de PB com HMBi, 3) 15,6% PB com RPM e 4) Controle positivo com 16,8% de PB sem metionina. A lisina como proporção da PM foi de 6,59 e 6,17% nas dietas de baixa e alta proteína. A metionina foi de 1,84, 2,21, 2,21 e 1,85% da PM resultando em relação entre lisina e metionina de 3,58, 2,98, 2,98 e 3,33 para os tratamentos de 1 a 4, respectivamente. O desempenho não foi afetado pelo teor de PB das dietas e a suplementação com metionina aumentou o teor e tendeu a aumentar a produção de proteína no leite em relação às dietas do controle positivo e negativo. A EUN aumentou com a suplementação de RPM (34,1% do N ingerido), foi intermediária para as dietas controle negativo e HMBi (32,2%) e reduziu na dieta de alta proteína (30,2%). Estes dados sugerem que a suplementação com RPM pode compensar a perda de desempenho com a redução do teor de proteína da dieta e aumentar a EUN.

Sinclair *et al.* (2014), em estudo de meta-análise de dados concluíram que para dietas de baixa proteína (< 15,0% PB) a resposta em produção de proteína no leite à suplementação com RPM foi pequena. Giallongo *et al.* (2015) avaliaram o efeito de RPM (Mepron; Evonik Industries AG, Hanau, Alemanha) em dietas deficientes em PM. As dietas foram: 1) 15,8% de PB e balanço de PM = -244 g/d, e 2) 15,8% de PB + 18 g/d RPM e balanço de PM = -116 g/d. Não houve efeito da suplementação com RPM sobre a produção ou o teor de sólidos no leite e nem sobre a EUN. Entretanto, para dietas com mais de 16% de PB a suplementação com RPM na forma de Smartamine ou Mepron aumenta consistentemente o teor e a produção de proteína no leite (PATTON, 2010; ZANTON *et al.*, 2014).

Broderick *et al.* (2008) avaliaram a suplementação com RPM (Mepron - Degussa Corp., Kennesaw, GA) em diferentes teores de PB. As dietas contendo 18,6, 17,3, 16,1 e 14,8% de PB foram suplementadas com 0, 5, 10 e 15 g/d de RPM. A produção de leite e de proteína no leite aumentou em 1,9 kg/d e 55 g/d respectivamente para os tratamentos com 17,3 e 16,1% de PB em relação à dieta com 18,6 ou 14,8% de PB, e não houve efeito sobre o teor de proteína do leite e o CMS. O NUL aumentou de forma linear com o incremento no teor de PB na dieta e foi 7,9, 9,5, 11,8 e 14,5 mg/dL. A EUN foi 34,0% do N ingerido na dieta com 14,8% de PB, 29,9 e 31,7% para os teores de 16,1 e 17,3% de PB (sem diferença estatística), e 26,2% na dieta com 18,6% de PB. Estes dados sugerem uma possível interação entre o teor de proteína da dieta e a suplementação com RPM.

Broderick *et al.* (2008) testaram a interação entre o teor de proteína da dieta e a suplementação com RPM. Foram avaliadas dietas com 17,3 e 16,1% de PB com ou sem adição de RPM (Mepron - Degussa Corp., Kennesaw, GA). A produção de leite das vacas (44 ± 5 kg/d) e o estágio de lactação ($DEL = 116 \pm 29$) também foram similares ao do experimento

anterior. Não houve efeito da suplementação com RPM e da interação com o teor de PB da dieta sobre os parâmetros de desempenho ou EUN. A dieta de proteína baixa reduziu o CMS (0,5 kg/d), a produção de leite (1,0 kg/d) e a proteína no leite (40 g/d) e aumentou a EUN (32,2 vs 34,5% do N ingerido).

Leonardi, Stevenson e Armentano (2003) também avaliaram o efeito da interação entre o teor de proteína da dieta e a suplementação com RPM. Estes autores utilizaram 24 vacas (45,5 ± 6,2 kg/d de leite e 93 ± 24 DEL) em delineamento do tipo QL. Os tratamentos foram dois teores de PB, 16,1 e 18,5% da MS, com ou sem adição de RPM (Mepron M85 - Degussa, Allendale, NJ). A dieta de baixa PB continha 6,5 e 1,8% de lisina e metionina como proporção da PM e a dieta de alta proteína continha 6,3 e 1,7%. A suplementação com RPM aumentou a proporção de metionina na PM para 2,2% na dieta de PB baixa e 2,1% na dieta de PB alta. A relação entre lisina e metionina foi de 3,6 e 3,7 para alta e baixa proteína sem metionina suplementar e 3,0 para os dois teores de PB quando suplementados com metionina. Não houve efeito do teor de PB ou da suplementação de metionina sobre a produção de leite ou de proteína no leite. A redução do teor de PB diminuiu o NUL (14,4 vs 10,5 mg/dL, $P < 0,01$) e aumentou a EUN de 30,3 para 37,1%, mas estes efeitos foram independentes da suplementação com metionina.

Robinson (2010) analisou um banco de dados com 54 tratamentos onde o teor de proteína (média ± desvio padrão) das dietas foi de 17,2 ± 2,1% de PB na MS e observou que a suplementação com RPM aumentou o teor de proteína no leite em 0,07 pontos percentuais, mas não teve efeito sobre a produção de leite. O efeito sobre o teor de proteína parece ser consistente, mas curiosamente essa resposta é independente da produção de proteína no leite (LEAN *et al.*, 2018). Patton (2010) observaram que o teor de proteína do leite aumentou em 0,069 pontos percentuais em 32 estudos em que a produção de proteína no leite aumentou em 48 g/d e houve aumento pelo menos numérico da produção de leite. Já para outros 43 estudos o teor de proteína foi similar, 0,062 pontos percentuais, mas a produção de proteína aumentou somente 1,9 g/d e a produção de leite reduziu pelo menos numericamente com a suplementação de RPM. Nestas dietas, o balanço de PM parece ser suficiente para suprir os AA em quantidade adequada independentemente da proporção ideal na PM.

Os ganhos em EUN com a suplementação de AA protegidos também foram modestos, dietas suplementadas somente com RPM ou RPM + lisina aumentaram a EUN em 2,1 e 3,9% do N ingerido respectivamente em relação à dieta controle (ROBINSON, 2010). A EUN das dietas controle foi de 28,5% para os experimentos com RPM e 27,8% do N ingerido para os trabalhos com suplementação de RPM + Lisina. Neste caso o aumento em EUN foi de 0,5 e 1,2

pontos percentuais em relação às dietas controle para a suplementação com RPM ou RPM + Lisina respectivamente.

A resposta em produção de leite ou proteína do leite à suplementação com RPM em dietas com teor adequado de PB é independente do teor de PB da dieta (BRODERICK; STEVENSON; PATTON, 2009). A resposta à suplementação com AA protegidos da degradação ruminal em dietas com baixo teor de PB requer mais investigação. Nessas dietas deficientes em PM outros AA podem limitar o desempenho. A lisina pode ser limitante ou foi co-limitante com a metionina (ARMENTANO; BERTICS; DUCHARME, 1997) e a histidina pode ser limitante em dietas de baixa proteína (LEE *et al.*, 2012a). Entretanto, a suplementação com metionina e histidina (GIALLONGO *et al.*, 2016) ou metionina e lisina (LEE *et al.*, 2012a, 2015) em dietas deficientes em PM não resultaram em aumento de produção de leite, proteína no leite ou melhora na EUN.

2.9 Efeito da metionina sobre a concentração plasmática de glicose e aminoácidos

Os AA absorvidos no trato gastrointestinal (TGI) não estão prontamente disponíveis para utilização pela glândula mamária ou tecidos periféricos devido à utilização de AA pelo próprio TGI ou devido à sua metabolização pelo fígado (LAPIERRE *et al.*, 2012). Os AA essenciais são divididos em dois grupos de acordo com a sua rota metabólica até a circulação arterial: 1) Lisina, Leucina, Isoleucina e Valina são AA que sofrem pouca metabolização hepática, e 2) Histidina, Metionina e Fenilalanina são removidos pelo fígado em proporção que varia de 30 a 50% do aparecimento portal líquido (LAPIERRE *et al.*, 2005). O fígado tem um papel central na regulação da disponibilidade de AA no sangue e o aumento do influxo total de AA aumenta a remoção hepática (HANIGAN *et al.*, 2004). Raggio *et al.* (2004) demonstraram que a remoção hepática de metionina aumentou linearmente de 28 para 44%, em relação à absorção portal líquida, quando compararam dieta de alta e baixa PM.

Apesar da remoção hepática, a infusão de DL-metionina no duodeno ou a suplementação com RPM aumentam consistentemente a concentração plasmática de metionina (BLUM; BRUCKMAIER; JANS, 1999; BRODERICK; KOWALCZYK; SATTER, 1970; RULQUIN; DELABY, 1997). Berthiaume *et al.* (2006) utilizaram seis vacas multicateterizadas para avaliar o efeito de RPM sobre o metabolismo esplânico. A dieta foi isoenergética e isoproteica e continha com base na MS 53% de forragem e 47% de concentrado. Os tratamentos foram três doses de RPM 0, 36 e 72 g/d. Houve uma tendência ($P = 0,10$) para aumento linear no aparecimento portal líquido e no fluxo hepático de metionina, mas a remoção pelo fígado

não foi afetada pelo aumento da suplementação. A concentração plasmática de metionina também aumentou linearmente.

A suplementação de RPM aumentou a concentração plasmática dos AA de cadeia ramificada (BCAA) isoleucina, leucina e valina (CASPER *et al.*, 1987), mas esse efeito não foi observado quando DL-metionina foi infundida no duodeno (GUINARD; RULQUIN, 1995; PISULEWSKI *et al.*, 1996). Neste caso, um possível efeito da metionina no rúmen pode explicar parcialmente essa diferença entre experimentos. Bach e Stern (1999) em cultura contínua formularam dietas com alto e baixo suprimento de metionina manipulando os ingredientes da dieta. Estes autores demonstraram que a dieta rica em metionina reduziu a degradação da leucina no meio de cultura e sugeriram que in vivo o fluxo desse AA para o duodeno pode aumentar em alto suprimento ruminal de metionina. Similarmente Velle *et al.* (1997) infundiram doses crescentes 75, 150, 300 e 600 μM de metionina no rúmen de duas vacas não lactantes recebendo feno e concentrado e observaram que a concentração de leucina, valina, histidina e em menor magnitude isoleucina aumentaram significativamente para a dose de 600 μM . Estes resultados são coerentes com o aumento do fluxo pós-hepático de isoleucina e leucina, medido pelo aparecimento esplânico líquido, com a suplementação de RPM (BERTHIAUME *et al.*, 2006).

Entretanto, outros autores não observaram diferença na concentração plasmática de BCAA utilizando RPM (ILLG; SOMMERFELDT; SCHINGOETHE, 1987; MUNNEKE; SCHINGOETHE; CASPER, 1991) ou infusão de DL-metionina no duodeno (PISULEWSKI *et al.*, 1996). Contrariamente Guinard e Rulquin (1995) observaram redução na concentração plasmática de BCAA utilizando infusão duodenal de DL-metionina. Blum, Bruckmaier e Jans (1999) também observaram redução na concentração plasmática de BCAA utilizando RPM. Como os BCAA são pouco metabolizados pelo fígado, a glândula mamária passa a desempenhar um papel no metabolismo pós-absortivo de BCAA. Uma maior captação de BCAA pela glândula mamária sem incremento proporcional na síntese de proteína no leite foi observada com a suplementação de RPM (BERTHIAUME *et al.*, 2006; CASPER *et al.*, 1987) indicando que além da utilização para a síntese de proteína houve uma maior oxidação destes AA pela glândula mamária. Entretanto, Varvikko *et al.* (1999) observaram redução na concentração plasmática de BCAA mas não observaram maior captação destes AA pela glândula mamária, o que sugere uma utilização de BCAA por outros tecidos (PAPET *et al.*, 1992).

Pisulewski *et al.* (1996) infundiram doses crescentes de DL-metionina 0, 6, 12, 18 e 24 g/d no duodeno de vacas em início da lactação e não observaram efeito sobre a concentração

plasmática de glicose. O balanço entre a produção de glicose e a utilização pelos tecidos determina a concentração no plasma. A produção líquida de glicose pelo fígado não foi afetada quando doses crescentes 0, 32 e 76 g/d de RPM foram suplementadas (BERTHIAUME *et al.*, 2006). Além disso, a metionina não afetou a utilização da glicose plasmática pela glândula mamária, avaliada pela eficiência de captação de glicose, quando infundida no duodeno como DL-metionina (GUINARD; RULQUIN, 1995; VARVIKKO *et al.*, 1999) ou pela suplementação na forma de RPM (BERTHIAUME *et al.*, 2006). Preynat *et al.* (2009) utilizando infusão de glicose marcada demonstraram que a suplementação de 18 g/d de RPM não alterou a taxa de oxidação de glicose no corpo e nem a utilização de glicose pela glândula mamária para a síntese de lactose.

A metionina pode aumentar a concentração plasmática de insulina (BLUM; BRUCKMAIER; JANS, 1999). Entretanto, o efeito da metionina sobre a concentração plasmática de insulina é baixo (KUHARA *et al.*, 1991) e não tem sido demonstrado com a suplementação de RPM (GIALLONGO *et al.*, 2016). Berthiaume *et al.* (2001) observaram aumento da concentração plasmática de glicose que foi independente do teor de insulina no sangue.

REFERÊNCIAS

- ABDELMEGEID, M. K. *et al.* Rumen-protected methionine during the periparturient period in dairy cows and its effects on abundance of major species of ruminal bacteria. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, n. 9, p. 17, Feb. 2018.
- ARGYLE, J. L.; BALDWIN, R. L. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial growth yields. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 72, n. 8, p. 2017-2027, Aug. 1989.
- ARMENTANO, L. E.; BERTICS, S. J.; DUCHARME, G. A. Response of lactating cows to methionine or methionine plus lysine added to high protein diets based on alfalfa and heated soybeans. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 6, p. 1194-1199, June 1997.
- 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**, Lancaster, v. 88, Suppl. 1, p. 9-21, May 2005.
- BACH, A.; STERN, M. D. Effects of different levels of methionine and ruminally undegradable protein on the amino acid profile of effluent from continuous culture fermenters. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 77, n. 12, p. 3377-3384, Dec. 1999.
- BALCELLS, J. *et al.* Rumen digestion and urinary excretion of purine derivatives in response to urea supplementation of sodium-treated straw fed to sheep. **British Journal of Nutrition**, [Cambridge], v. 69, n. 3, p. 721-723, May 1993.
- BARROS, T. *et al.* Effects of dietary crude protein concentration on late-lactation dairy cow performance and indicators of nitrogen utilization. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 100, n. 7, p. 5434-5448, July 2017.
- BERTHIAUME, R. *et al.* Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, 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**, Lancaster, v. 84, n. 1, p. 194-203, Jan. 2001.
- BLUM, J. W.; BRUCKMAIER, R. M.; JANS, F. Rumen-protected methionine fed to dairy cows: Bioavailability and effects on plasma amino acid pattern and plasma metabolite and insulin concentrations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 9, p. 1991-1998, Sept. 1999.
- BORTON, L. R. *et al.* Simulation to evaluate dairy manure systems. **Applied Engineering in Agriculture**, St. Joseph, v. 11, n. 2, p. 301-310, 1995.

BOUCHER, S. E. *et al.* Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 90, n. 12, p. 5619-5633, Dec. 2007.

BRITO, A. F. *et al.* Effects of feeding formate-treated alfalfa silage or red clover silage on omasal nutrient flow and microbial protein synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 90, n. 3, p. 1392-1404, Mar. 2007.

BRODERICK, G. A. Effects of varying dietary protein and energy levels on the production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, n. 4, p. 1370-1381, Apr. 2003.

BRODERICK, G. A. *et al.* Effect of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 91, n. 3, p. 1092-1102, Mar. 2008.

BRODERICK, G. A.; CLAYTON, M. K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, Nov. 1997.

BRODERICK, G. A.; KOWALCZYK, T.; SATTER, L. D. Milk production response to supplementation with encapsulated methionine per os or casein per abomasum. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 53, n. 12, p. 1714-1721, Dec. 1970.

BRODERICK, G. A.; REYNAL, S. M. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, June 2009.

BRODERICK, G. A.; STEVENSON, M. J.; PATTON, R. A. Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 6, p. 2719-2728, June 2009.

BULL, L. S.; VANDERSALL, J. H. Sulfur source for in vitro cellulose digestion and in vivo ration utilization, nitrogen metabolism, and sulfur balance. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 56, n. 1, p. 106-112, Jan. 1973.

BURGOS, S. A. *et al.* Prediction of ammonia emission from dairy cattle manure based on milk urea nitrogen: relation of milk urea nitrogen to ammonia emissions. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 93, n. 6, p. 2377-2386, June 2010.

CABRITA, A. R. J. *et al.* Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, n. 9, p. 4647-4656, Sept. 2011.

CASPER, D. P. *et al.* Protected methionine supplementation with extruded blend of soybeans and soybean meal for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, n. 2, p. 321-330, Feb. 1987.

- CASTILLO, A. R. *et al.* A review of efficiency of nitrogen utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, v. 9, n. 1, p. 1-32, 2000.
- CHALUPA, W. Rumen bypass and protection of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 58, n. 8, p. 1198-1218, Aug. 1975.
- CHEN, Z. H. *et al.* Effect of feeding different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, n. 4, p. 1978-1988, Apr. 2011.
- CHIKUNYA, S. *et al.* Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 63, n. 1-4, p. 333-340, Dec. 1996.
- CLARK, J. H. *et al.* Milk production, nitrogen utilization and glucose synthesis in lactating cows infused postruminally with sodium caseinate and glucose. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 107, n. 4, p. 631-644, Apr. 1977.
- CLARK, J. H. Lactational responses to postruminal administration of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 58, n. 8, p. 1178-1197, Aug. 1975.
- COTTA, M. A.; RUSSELL, J. B. Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 65, n. 2, p. 226-234, Feb. 1982.
- CUNNINGHAM, K. D. *et al.* Influence of source and amount of dietary protein on milk yield by cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 79, n. 4, p. 620-630, Apr. 1996.
- CYRIAC, J. *et al.* Lactation performance of mid-lactation dairy cows fed ruminally degradable protein at concentrations lower than National Research Council recommendations. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 91, n. 12, p. 4704-4713, Dec. 2008.
- DERRIG, R. G.; CLARK, J. H.; DAVIS, C. L. Effect of abomasal infusion of sodium caseinate on milk yield, nitrogen utilization and amino acid nutrition of the dairy cow. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 104, n. 2, p. 151-159, Feb. 1974.
- DINN, N. E.; SHELFORD, J. A.; FISHER, L. J. Use of the Cornell net carbohydrate and protein system and rumen-protected lysine and methionine to reduce nitrogen excretion from lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 1, p. 229-237, Jan. 1998.
- DOEPEL, L. *et al.* Milk protein synthesis as a function of amino acid supply. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 5, p. 1279-1297, May 2004.
- FADUL-PACHECO, L. *et al.* Nitrogen efficiency of eastern Canadian dairy herds: Effect on production performance and farm profitability. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 100, n. 8, p. 1-10, Aug. 2017.

- FELICE, M. de *et al.* Growth inhibition as a consequence of antagonism between related amino acids: effect of valine in *Escherichia coli* K-12. **Microbiological Reviews**, Washington, DC, v. 43, n. 1, p. 42-58, Mar. 1979.
- FLEMING, A. J. *et al.* Assessing bioavailability of ruminally protected methionine and lysine prototypes. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 102, n. 5, p. 4014-4024, May 2019.
- FOX, D. G. *et al.* The cornell net carbohydrate and protein system model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 112, n. 1-4, p. 29-78, Feb. 2004.
- FRANK, B.; PERSSON, M.; GUSTAFSSON, G. Feeding dairy cows for decreased ammonia emission. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 171-179, Aug. 2002.
- GIALLONGO, F. *et al.* Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 6, p. 4437-4452, June 2016.
- GIALLONGO, F. *et al.* Effects of slow-release urea and rumen-protected methionine and histidine on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, n. 5, p. 3292-3308, May 2015.
- GIL, L. A.; SHIRLEY, R. L.; MOORE, J. E. Effect of methionine hydroxy analog on bacterial protein synthesis from urea and glucose, starch or cellulose by rumen microbes, in vitro. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 37, n. 1, p. 159-163, July 1973.
- GRAULET, B.; RICHARD, C.; ROBERT, J. C. Methionine availability in plasma of dairy cows supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 88, n. 10, p. 3640-3649, Oct. 2005.
- GRISWOLD, K. E. *et al.* Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 74, n. 2, p. 483-491, Feb. 1996.
- GRISWOLD, K. E. *et al.* Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 81, n. 1, p. 329-336, Jan. 2003.
- GUINARD, J.; RULQUIN, H. Effects of graded amounts of duodenal infusions of methionine on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 78, n. 10, p. 2196-2207, Oct. 1995.
- HANIGAN, M. D. *et al.* A model of net amino acid absorption and utilization by the portal-drained viscera of the lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 12, p. 4247-4268, Dec. 2004.
- HRISTOV, A. N. *et al.* Short communication: variability in milk urea nitrogen and dairy total mixed ration composition in the northeastern United States. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 101, n. 2, p. 1579-1584, Feb. 2018.

HRISTOV, A. N.; PRICE, W. J.; SHAFII, B. A meta-analysis examining the relationship among dietary factors, dry matter intake, and milk and milk protein yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 7, p. 2184-2196, July 2004.

HUHTANEN, P. *et al.* Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, n. 5, p. 3182-3196, May 2015.

HUHTANEN, P. *et al.* Utilization and partition of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 91, n. 9, p. 3589-3599, Sept. 2008.

HUHTANEN, P.; HRISTOV, A. N. A meta-analysis of the effects of dietary protein concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 92, n. 7, p. 3222-3232, July 2009.

ILLG, D. J.; SOMMERFELDT, J. L.; SCHINGOETHE, D. J. Lactational and systemic responses to the supplementation of protected methionine in soybean meal diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 70, n. 3, p. 620-629, Mar. 1987.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 88, (Suppl 1), p. 22-37, May 2005a.

IPHARRAGUERRE, I. R.; CLARK, J. H. Varying protein and starch in the diet of dairy cows. II. Effects on performance and nitrogen utilization for milk production. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 88, n. 7, p. 2556-2570, July 2005b.

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

JONES, D. F.; HOOVER, W. H.; WEBSTER, T. K. M. Effects of concentrations of peptides on microbial metabolism in continuous culture. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 76, n. 2, p. 611-616, Feb. 1998.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; ERDMAN, R. A. Using milk urea nitrogen to predict nitrogen excretion and utilization efficiency in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 10, p. 2681-2692, Oct. 1998.

JONKER, J. S.; KOHN, R. A.; HIGH, J. Dairy herd management practices that impact nitrogen utilization efficiency. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 85, n. 5, p. 1218-1226, May 2002.

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**, Lancaster, v. 88, n. 7, p. 2601-2607, 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**, Lancaster, v. 85, n. 8, p. 2015-2022, Aug. 2002.

KALSCHEUR, K. F. *et al.* Effects of dietary crude protein concentration and degradability on milk production responses of early, mid, and late lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 3, p. 545-554, Mar. 1999.

KALSCHEUR, K. F. *et al.* Milk production of dairy cows fed differing concentrations of rumen-degraded protein. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 1, p. 249-259, Jan. 2006.

KANG-MEZNARICH, J. H.; BRODERICK, G. A. Effects of incremental urea supplementation on ruminal ammonia concentration and bacterial protein formation. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 51, n. 2, p. 422-431, Aug. 1980.

KAUFFMAN, A. J.; ST-PIERRE, N. R. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in holstein and jersey cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 84, n. 10, p. 2284-2294, Oct. 2001.

KUHARA, T. *et al.* Effects of intravenous infusion of 17 amino acids on the secretion of GH, glucagon, and insulin in sheep. **American Physiological Society**, Bethesda, MD, v. 260, n. 1, p. 21-26, Jan. 1991.

LAPIERRE, H. *et al.* The route of absorbed nitrogen into milk protein. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 80, n. 1, p. 11-22, Mar. 2005.

LAPIERRE, H. *et al.* Triennial Lactation Symposium: mammary metabolism of amino acids in dairy cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 90, n. 5, p. 1708-1725, May 2012.

LEAN, I. J. *et al.* Meta-analysis to predict the effects of metabolizable amino acids on dairy cattle performance. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 101, n. 1, p. 340-364, Jan. 2018.

LEÃO, G. F. M. *et al.* Factors affecting performance responses to supplementation of rumen-protected methionine for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 100, Suppl. 2, p. 93-94, 2017. Abstract M239.

LEE, C. *et al.* Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 98, n. 3, p. 1885-1902, Mar. 2015.

LEE, C. *et al.* Effects of dietary protein concentration and coconut oil supplementation on nitrogen utilization and production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, n. 11, p. 5544-5557, Nov. 2011.

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**, Lancaster, 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**, Lancaster, v. 95, n. 10, p. 6042-6056, Oct. 2012b.

LEONARDI, C.; STEVENSON, M.; ARMENTANO, L. E. Effect of two levels of crude protein and methionine supplementation on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 86, n. 12, p. 4033-4042, Dec. 2003.

LESSA, A. C. R. *et al.* Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures contribute differently to direct and indirect soil nitrous oxide emissions. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, New York, v. 190, p. 104-111, June 2014.

LING, J. R.; ARMSTEAD, I. P. The in vitro uptake and metabolism of peptides and amino acids by five species of rumen bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 78, n. 2, p. 116-124, eb. 1995.

LOBLEY, G. E. *et al.* Absorption and digestive tract metabolism of 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid in lambs. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 9, p. 3508-3521, Sept. 2006.

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**, Lancaster, v. 68, n. 12, p. 3350-3354, Dec. 1985.

MARTIN, C. *et al.* Methionine analogues HMB and HMBi increase the abundance of cellulolytic bacterial representatives in the rumen of cattle with no direct effects on fibre degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 182, n. 1-4, p. 16-24, June 2013.

MARTINS, C. M. M. R. *et al.* Effect of dietary crude protein degradability and corn processing on lactation performance, milk protein composition, and stability. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 102, n. 5, p. 4165-4178, May 2019.

MUNNEKE, R. L.; SCHINGOETHE, D. J.; CASPER, D. P. Lactational evaluation of ruminally protected methionine in diets containing extruded soybeans and urea. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 1, p. 227-233, Jan. 1991.

MUTSVANGWA, T. *et al.* Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 99, n. 8, p. 6298-6310, Aug. 2016.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, DC: National Academy of Sciences, 2001. 381 p.

NEUDOERFFER, T. S.; DUNCAN, D. B.; HORNEY, F. D. The extent of release of encapsulated methionine in the intestine of cattle. **British Journal of Nutrition**, [Cambridge], v. 25, n. 3, p. 333-341, 1971.

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

NOFTSGER, S.; ST-PIERRE, N. R.; SYLVESTER, J. T. Determination of rumen degradability and ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 88, n. 1, p. 223-237, Jan. 2005.

NOUSIAINEN, J.; SHINGFIELD, K. J.; HUHTANEN, P. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 2, p. 386-398, Feb. 2004.

OLMOS COLMENERO, J. J.; BRODERICK, G. A. Effect of amount and ruminal degradability of soybean meal protein on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 5, p. 1635-1643, May 2006a.

OLMOS COLMENERO, J. J.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary crude protein concentration on milk production and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 5, p. 1704-1712, May 2006b.

OVERTON, T. R. *et al.* Evaluation of a ruminally protected methionine product for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 79, n. 4, p. 631-638, Apr. 1996.

OVERTON, T. R.; EMMERT, L. S.; CLARK, J. H. Effects of source of carbohydrate and protein and rumen-protected methionine on performance of cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 1, p. 221-228, Jan. 1998.

PAPET, I. *et al.* Regulation of branched chain amino acid metabolism in ruminants. **Diabete & Metabolisme**, Paris, v. 18, n. 1, p. 122-128, 1992.

PARKER, D. S. *et al.* Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 54, n. 2, p. 549-563, July 1995.

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**, Lancaster, v. 93, n. 5, p. 2105-2118, May 2010.

PEREIRA, M. N. *et al.* Methionine precursor effects on lactation performance of dairy cows fed raw or heated soybeans. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 104, n. 3, p. 2996-3007, 2021.

PISULEWSKI, P. M. *et al.* Lactational and systemic responses of dairy cows to postruminal infusions of increasing amounts of methionine. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 79, n. 10, p. 1781-1791, Oct. 1996.

POLAN, C. E. *et al.* Responses of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 74, n. 9, p. 2997-3013, Sept. 1991.

POWELL, J. M.; WATTIAUX, M. A.; BRODERICK, G. A. Short communication: evaluation of milk urea nitrogen as a management tool to reduce ammonia emissions from dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 94, n. 9, p. 4690-4694, Sept. 2011.

PREYNAT, A. *et al.* Effects of supplements of folic acid, vitamin B12, and rumen-protected methionine on whole body metabolism of methionine and glucose in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 2, p. 677-689, 2009.

RAGGIO, G. *et al.* Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino acids in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 87, n. 10, p. 3461-3472, Oct. 2004.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 88, n. 11, p. 4045-4064, Nov. 2005.

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.

ROGERS, J. A. *et al.* Milk production and nitrogen utilization by dairy cows infused postruminally with sodium caseinate, soybean meal, or cottonseed meal. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 67, n. 9, p. 1928-1935, Sept. 1984.

ROTZ, C. A. *et al.* Feeding strategy, nitrogen cycling, and profitability of dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 12, p. 2841-2855, 1999.

RULQUIN, H. Détermination de certains acides aminés limitants chez la vache laitière par la méthode des administrations post-ruminales. **Reproduction Nutrition Développement**, Paris, v. 27, n. 1B, p. 299-300, 1987.

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

RULQUIN, H.; DELABY, L. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 10, p. 2513-2522, Oct. 1997.

RULQUIN, H.; KOWALCZYK, J. Development of a method for measuring lysine and methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna, v. 12, n. 3, p. 465-474, 2003.

RULQUIN, H.; LE HENAFF, F.; VÉRITÉ, R. Effects on milk protein yield of graded levels of lysine infused into the duodenum of dairy cows fed diets with two levels of protein. **Reproduction Nutrition Development**, Les Ulis, Suppl. 2, p. 238, 1990.

RUSSELL, J. B.; SNIFFEN, C. J.; VAN SOEST, J. J. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 66, n. 4, p. 763-782, Apr. 1983.

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

RUSSELL, J. B. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 70, n. 11, p. 3551-3561, Nov. 1992.

SANTOS, F. A. *et al.* Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 12, p. 3182-3213, Dec. 1998.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, [Cambridge], v. 32, n. 2, p. 199-208, Sept. 1974.

SCHINGOETHE, D. J. *et al.* Lactational response to soybean meal, heated soybean meal, and extruded soybeans with ruminally protected methionine. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 71, n. 1, p. 173-180, Jan. 1988.

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

SCHWAB, C. G.; ORDWAY, R. S.; WHITEHOUSE, N. L. Amino acid balancing in the context of mp and RUP requirements. *In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 2004, Gainesville. Proceedings [...].* Gainesville: [s.n.], 2004. p. 10-25.

SCHWAB, C. G.; SATTER, L. D.; CLAY, A. B. Response of lactating dairy cows to abomasal infusion of amino acids. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 59, n. 7, p. 1254-1270, July 1976.

SINCLAIR, K. D. *et al.* Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. **Journal Animal**, Cambridge, v. 8, n. 2, p. 262-274, Feb. 2014.

SNIFFEN, C. J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, Nov. 1992.

SOTO, R. C. *et al.* Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 49, n. 1-2, p. 151-161, Sept. 1994.

SPANGHERO, M.; KOWALSKI, Z. M. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 52, n. 2, p. 113-122, Dec. 1997.

SPEK, J. W. *et al.* Prediction of urinary nitrogen and urinary urea nitrogen excretion by lactating dairy cattle in northwestern Europe and North America: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 96, n. 7, p. 4310-4322, July 2013.

- SPIRES, H. R. *et al.* Milk production and nitrogen utilization in response to postruminal infusion of sodium caseinate in lactating cows. **The Journal of Nutrition**, Springfield, Ill, v. 105, n. 9, p. 1111-1121, Sept. 1975.
- ST-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**, Lancaster, v. 88, n. 7, p. 2487-2497, July 2005.
- TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 75, n. 1, p. 345-357, Jan. 1992.
- VARVIKKO, T. *et al.* Lactation and metabolic responses to graded abomasal doses of methionine and lysine in cows fed grass silage diets. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 82, n. 12, p. 2659-2673, Dec. 1999.
- VELLE, W. *et al.* Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 12, p. 3325-3332, Dec. 1997.
- VIK-MO, L. *et al.* Blood metabolites in cows abomasally infused with casein or glucose. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 57, n. 9, p. 1024-1030, Sept. 1974.
- VIRTANEN, A. I. Milk production of cows on protein-free feed. **Science**, New York, v. 153, n. 3744, p. 1603-1614, Sept. 1966.
- WILKERSON, V. A.; GLENN, B. P.; McLEOD, K. R. Energy and nitrogen balance in lactating cows fed diets containing dry or high moisture corn in either rolled or ground form. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 10, p. 2487-2496, Oct. 1997.
- WINDSCHITL, P. M.; STERN, M. D. Influence of methionine derivatives on effluent flow of methionine from continuous culture of ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, IL, v. 66, n. 11, p. 2937-2947, Nov. 1988.
- YAN, T. *et al.* Relationships among manure nitrogen output and dietary and animal factors in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 89, n. 10, p. 3981-3991, Oct. 2006.
- YANG, C. M. J.; SCHINGOETHE, D. J.; CASPER, D. P. Protected Methionine and Heat-Treated Soybean Meal for High Producing Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 69, n. 9, p. 2348-2357, 1986.
- ZANTON, G. I. *et al.* Meta-analysis of lactation performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or postruminal infusion of methionine. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 97, n. 11, p. 7085-7101, Nov. 2014.

SEGUNDA PARTE - ARTIGO**ARTIGO 1 - RUMEN PROTECTED METHIONINE FOR DAIRY COWS ON HIGH
OR LOW PROTEIN DIETS****(VERSÃO PRELIMINAR)****Artigo formatado de acordo com as normas da revista *Livestock Science*.****Rumen protected methionine for dairy cows on high or low protein diets****Ricardo P. Melo^a, Josiane P. Santos^a, Wesley R. Silva^a, Rayana B. Silva^b, Renata A. N.
Pereira^c, Fernanda Lopes^d, Charles G. Schwab^e, and Marcos N. Pereira^{a1}**^a Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Lavras, MG 37200-900, Brazil^b Better Nature Research Center, Ijaci, MG 37.218-000, Brazil.^c Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Sul de
Minas, Lavras, MG 37200-900, Brazil.^d Fernanda Lopes, Adisseo South America, São Paulo, SP 05804-900, Brazil.^e Schwab Consulting, LLC, Boscobel, WI 53805, USA.¹Corresponding author: Marcos Neves Pereira. mpereira@ufla.br

29 concentration was a plausible marker of the capacity of a RPM source to supply digestible methionine,
30 independently of dietary protein content. The consideration of the ruminal requirement for true protein
31 may favor rumen function when low protein diets are adopted.

32 **Keywords:** nitrogen balance, nitrogen efficiency, plasma amino acids, protein models, rumen
33 function

34 INTRODUCTION

35 Excessive protein in the diet relative to model predicted requirements of rumen degradable
36 protein (**RDP**) or metabolizable protein (**MP**) (Fox et al., 2004; National Research Council [NRC],
37 2001) can increase dietary nitrogen loss in urine and feces and reduces the efficiency of N usage for
38 milk protein synthesis (**MNE**) (Castillo et al., 2000; Huhtanen et al., 2008). Adequate protein in the diet
39 can improve farm profitability (Fadul-Pacheco et al., 2017) and herd reproductive efficiency (Sinclair
40 et al., 2014) and can reduce the negative impact of manure N on the environment (Lessa et al., 2014;
41 Rotz et al., 1999). Although low protein diets may have financial and environmental advantages, diets
42 with excessive protein supply are not uncommon in dairy herds. The possibility of reducing lactation
43 performance when low protein diets are fed is a frequent justification for the adoption of high protein
44 feeding, despite the lower MNE of high than low protein diets (Broderick, 2003; Olmos Colmenero and
45 Broderick, 2006). A survey of 9707 total mixed ration samples analyzed by a commercial laboratory
46 between 2007 and 2015 suggests that the adoption of low-protein diets has increased in 13 states of
47 northeastern United States (Hristov et al., 2018). Therefore, nutritional strategies that maximize MNE
48 and cow productivity in low protein diets deserve evaluation.

49 The supplementation of dairy cows with rumen protected methionine (**RPM**) has been proposed
50 as a nutritional strategy for the adoption of low protein diets without the undesirable negative effect of
51 low protein supply on lactation performance (Chen et al., 2011). However, although the supplementation
52 of low protein diets with methionine and lysine can increase milk protein secretion, the response seems
53 to be of low magnitude (Sinclair et al., 2014). Robinson (2010) estimated that the positive response in
54 milk yield to methionine or methionine and lysine supplementations was greater when the basal diet
55 contained high protein, and MNE was improved by amino acid (**AA**) supplementation. The meta-
56 analysis of Leão et al. (2017) suggests that diets with more than 16% crude protein (**CP**) were more

57 responsive to RPM supplementation than diets with less than 16% CP. The supplementation of diets
58 deficient in MP with RPM did not maintain the yields of milk and protein relative to an adequate MP
59 diet (Giallongo et al., 2016; Lee et al., 2012a). When a methionine precursor (HMBi) was added to a
60 low protein diet, there was a reduction in rumen microbial yield and there was no positive effect on milk
61 protein synthesis (Pereira et al., 2021), suggesting that ruminal events may determine the response of
62 dairy cows to AA supplementation. However, there was no interaction between diet protein content and
63 RPM supplementation on the yields of milk and protein when diet CP content was not excessively low
64 (Broderick et al., 2008; Broderick and Reynal, 2009; Leonardi et al., 2003). The effect of diet protein
65 profile on the response in milk protein synthesis to RPM supplementation requires further evaluation.

66 The objective of this research was to evaluate the effect of RPM supplementation to diets with
67 high (excessive) or low (adequate) protein supply on dry matter intake (**DMI**), rumen microbial yield,
68 total tract nutrient digestibility, dietary N partitioning, plasma AA concentration, and lactation
69 performance of dairy cows. Our hypothesis was that low protein diets would increase MNE without
70 impairing lactation performance and the marginal gain in milk protein synthesis to RPM
71 supplementation would be greater on high than on low protein supply.

72 MATERIALS AND METHODS

73 The protocol was approved by the University of Lavras Bioethics Committee in Utilization of
74 Animals (Protocol 083-16).

75 *Housing, Cows, Diets, and Experimental Design*

76 The experiment was conducted from May 30th to August 21th, 2016, in an open-walled, sand-
77 bedded tie-stall barn with fans and high-pressure sprinklers. Sixteen Holstein cows [38.4 ± 4.0 kg/d of
78 milk, 96 ± 34 days in milk, and 630 ± 53 kg of body weight (**BW**) at trial initiation], formed four 4×4
79 Latin squares, balanced for carry-over effects, with 21-day periods, and 14 days of adaptation.
80 Treatments were CP concentrations [% of dry matter (**DM**)] low (**LCP**) or high (**HCP**) in factorial
81 arrangement with no supplementation (**CTL**) or supplementation with RPM (Smartamine M. Adisseo
82 South America, São Paulo, Brazil). Diet LCP was formulated using NRC (2001) to be sufficient in
83 predicted RDP balance (2 g/d) and diet HCP was formulated by partially replacing citrus pulp in diet
84 LCP with soybean meal, at identical concentrations of starch and other feed ingredients in the diet (Table

85 1). Diets were formulated with the dairy cattle NRC (2001) model considering the mean pre-
86 experimental cow (38.4 kg/d, 3.50% fat, 3.10% crude protein, 96 days in milk, 630 kg mature Holstein)
87 and 24.5 kg/d of DM intake (**DMI**). The AA composition of feeds was from feed tables (NRC, 2001).
88 Compositions of the formulated diets were (LCP and HCP, respectively): 15.0 and 16.6% of CP in DM;
89 2 and 214 g/d of RDP balance; 9.9 and 10.7% of RDP in DM; 37.8 and 41.5 kg/d of MP allowable milk,
90 and 41.3 and 41.8 kg/d of net-energy allowable milk. Diets had 0.3% of urea in DM, supplying 193 g/d
91 of RDP to all diets. The assumed Smartamine M composition was: 75% CP and 25% ether extract in
92 DM, 20% fraction A in CP, 80% fraction C in CP, 100% Met in CP, and 100% rumen undegradable
93 protein (**RUP**) digestibility (Graulet et al., 2005; Rulquin and Kowalczyk, 2003). The Met goal supplied
94 by the diet was 2.2% of MP for the RPM diets. The predicted amount of Smartamine M to meet the
95 requirement was: 17 g/cow/d in diet LCP and 20 g/cow/d in diet HCP. Predicted Lys was 6.43% of MP
96 in LCP and 6.37% of MP in HCP, no attempt was made to adjust MP Lys concentrations. The total
97 mixed ration (**TMR**) was mixed 2×/d in a vertical stationary mixer and fed at 105 to 110% of daily *ad*
98 *libitum* intake at 0700 and 1300 h.

99 ***Variables and data collection***

100 Individual cow intake was assessed from days 15 to 21 of each period, by daily registering
101 amounts of feed offered and orts. Samples of ingredients were collected daily and composite samples
102 made per period. Likewise, ort samples were collected daily from each cow and composited per cow per
103 period. Composite samples were dried in forced-air oven at 55°C for 72 h and ground in a 1-mm mesh
104 diameter Willey mill. The DM content was determined by drying at 100°C for 24 h. The composition of
105 the consumed diet in nutrients was calculated by summation of the intake of nutrients per cow
106 (composition of offered ingredients minus orts on a DM basis) divided by the total DMI for the
107 treatment. The CP was determined by micro-Kjeldahl analysis according to method 990.03 and ether
108 extract (**EE**) was analyzed according to method 920.39 of AOAC International (Association of Official
109 Agricultural Chemists, 2012). Ash was analyzed by incineration at 550°C for 8 h. The ash-free neutral
110 detergent fiber (**NDF**) was determined by filtration in porous crucibles with heat stable amylase and
111 sodium sulfide (Van Soest et al., 1991). Starch plus free glucose was analyzed enzymatically according
112 to Hall (2009). The non-fiber carbohydrate fraction was calculated as: $100 - (\text{CP} + \text{EE} + \text{Ash} + \text{NDF})$.

113 The nutrient composition of feeds, the ingredient composition of the offered TMR, and cow data during
114 the experiment were used to generate NRC (2001) model predictions for each cow. The particle size
115 distribution of each TMR was measured on 8 samples per period with the Penn State Particle Separator
116 using the 8 mm and 19 mm diameters screens and pan (Lammers et al., 1996).

117 Cows were milked 3×/d starting at 0500, 1300, and 2000 h in an adjacent herringbone parlor.
118 Milk yield was recorded and sampled on days 17 to 21 of each period. An aliquot corresponding to 0.5%
119 of the yield of each milking was collected and composited per cow per day. Composite milk samples
120 were stored under refrigeration in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol preservative until
121 shipping to a commercial laboratory. Milk components and milk urea-N (MUN) concentrations were
122 measured by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska, USA) at the Laboratory of the
123 Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil). Milk energy secretion
124 (Mcal/d) was calculated as: $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of}$
125 milk (NRC, 2001) . Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated as (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) +$
126 $(0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. Energy corrected milk (kg/d) was: Milk
127 $\text{energy secretion}/0.70$ (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6% lactose).
128 The 4% fat corrected milk (kg/d) was calculated with the Gaines equation (NRC, 2001): $0.4 \times \text{kg of}$
129 $\text{milk} + 15 \times \text{kg of fat}$. BW after the morning and afternoon milking and body condition score (**BCS**) by
130 the same 3 evaluators (scale 1 to 5. Wildman et al., 1982) were measured on day 21.

131 The total tract apparent digestibility of DM, organic matter (**OM**), NDF, non-NDF OM, and
132 starch were determined by collection of feces on days 19 to 21. Feces were collected in buckets by 1
133 person for every 2 cows concurrent to defecation during 3 continuous 8-h sampling periods and weighed.
134 The second and third sampling periods were each delayed by 8 h, thus representing a 24-h collection.
135 Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately frozen along the collection period and
136 composite samples were formed per cow. Composite fecal samples were dehydrated for 72 h at 55°C in
137 a forced air oven. Concentrations of DM, NDF, CP, ash, and starch were determined as previously
138 described. The digestible OM intake (**DOMI**) was calculated.

139 Urine was collected in buckets (1 person/2 cows) concurrent to urination simultaneously to fecal
140 sampling (days 19 to 21) to estimate the relative ruminal microbial yield based on allantoin excretion

141 (mmol/d). A 20% sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L buckets and urine was added to it
142 during the collection period. At the end of the collection period, composite urine samples were diluted
143 1:5 with a 4% sulfuric acid solution and frozen at -20°C. Allantoin was analyzed according to Chen and
144 Gomes (1992). The allantoin to DOMI ratio (mmol/kg) was calculated to estimate rumen microbial yield
145 efficiency.

146 The proportion of N intake excreted in milk, urine, and feces was evaluated. Nitrogen in feces
147 and urine were measured as previously described for feeds and orts. Milk nitrogen was obtained by
148 dividing milk crude protein content by 6.38 (Ipharraguerre and Clark, 2005).

149 Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on day 18. Samples were collected in
150 vacutainer tubes containing EDTA immediately before the first daily feeding (0 h) and 1.5, 3, 6, 12, 18,
151 and 21 h post-feeding for plasma urea-N (**PUN**). Plasma was obtained by centrifugation at $1,800 \times g$ for
152 10 min and was stored at - 20°C until analysis (Urea 500. Doles Reagentes para Laboratórios Ltda,
153 Goiânia, Brazil). Plasma samples were also obtained at 0, 6, and 12 h post-feeding in tubes with EDTA
154 and sodium fluoride for glucose analysis (Glicose Enzimática Líquida. Doles Reagentes e Equipamentos
155 para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil).

156 Plasma AA we analyzed in samples obtained on day 18 at 6, 12, and 18 h post-feeding and
157 pooled per cow per period. Plasma was mixed with universally labeled ^{13}C amino acid (Algal amino
158 acid mixture, U-13C, 97-99%. Cambridge Isotope Laboratories, Tewksbury, USA) as internal standard
159 and deproteinized in 0.5 M perchloric acid. Deproteinized aliquots were derivatized using an amino acid
160 analysis kit, following provider instructions (EZ:faast CN:KH0-7337. Phenomenex, Torrence, USA).
161 Plasma AA were analyzed by isotope dilution ratio (Calder et al., 1999) using a liquid chromatography-
162 single quadrupole mass spectrometer system with electrospray ionization (LCMS 2020, Shimadzu,
163 Kyoto, Japan). Mobile phase A was 10 mM ammonium formate in water and phase B was 10 mM
164 ammonium formate in methanol, with a ramp from 68% B gradient at 0 min to 83% B gradient at 13
165 min. At 13.01 min, B gradient was dropped to 68% and kept for 17 min for recalibration.

166 *Statistical Analysis*

167 Data was analyzed using PROC MIXED of SAS (version 9.3, 2011; SAS Institute Inc., Cary,
168 USA). The statistical model for variables obtained once during each experimental period contained the

169 random effect of cow (1 to 16) and the fixed effects of period (1 to 4), protein (LCP, HCP), methionine
170 (CTL, RPM), and the interaction of protein and methionine. For variables obtained over time (PUN and
171 plasma glucose) the effect of time post-feeding and its 2- and 3-term interactions with protein and
172 methionine were added to the model. The interaction of cow, period, protein, and methionine was the
173 error term for the whole-plot effects. The best covariance structure was defined by the Schwarz's
174 Bayesian criteria among first-order autoregressive, compound symmetry, and unstructured. Degrees of
175 freedom were calculated using the Kenward-Roger option. Statistical significance was declared at $P \leq$
176 0.05 and trends at $P \leq 0.10$. When $P \leq 0.10$ for the interaction between protein and methionine pairwise
177 t-tests were performed among means ($P \leq 0.05$)

178 RESULTS

179 The composition of feeds used during the experiment and of the consumed diets in ingredients
180 and nutrients are in Tables 1 and 2. Crude protein concentration of the diet was 15.6% of DM in LCP
181 and 17.1% of DM in HCP. Soybean meal replaced citrus pulp in diet LCP to increase the protein
182 concentration of the diet. Diets had similar proportions of forage and starch from corn grain and whole
183 plant silage. The actual intake of Smartamine was: 16.9 g/d on diet LCP/RPM and 19.9 g/d on diet
184 HCP/RPM.

185 Dry matter intake, lactation performance, and body size are in Table 3. There was no detectable
186 treatment or interaction effects on DMI and milk yield. Except for the trend for the interaction between
187 protein and methionine for the concentrations of protein and casein in milk, for most variables evaluated
188 this interaction was not significant. The RPM increased the concentrations of protein and casein in milk
189 only when it supplemented diet HCP. The increase in milk protein concentration induced by RPM was
190 + 0.06 %-units in diet LCP (non-significant) and + 0.12 %-units in diet HCP. The increase in casein
191 concentration induced by RPM was + 0.10 %-units in diet HCP and + 0.05 % units in diet LCP (non-
192 significant). There was a trend for RPM to increase milk fat concentration (+ 0.08 %-units). Total solids
193 concentration was higher on RPM than CTL (+ 0.12 %-units), even with lower milk lactose
194 concentration (- 0.04 %-units). The high protein diets increased the concentration (+ 0.09 %-units) and
195 yield (+ 43 g/d) of milk protein relative to the LCP diets. The HCP diets also increased milk casein
196 content (+ 0.07 %-units) and yield (+ 36 g/d). Cows BW and BCS did not differ.

197 In Table 4 is the predicted protein and AA supply of the diets estimated with actual feed
198 composition, cow performance, and intake during the experiment. The estimates generated per cow with
199 the NRC (2001) dairy model suggest that the increase in protein concentration with soybean meal
200 increased both RDP and RUP proportions in diet DM. The rumen RDP balance was + 210 g/d higher
201 on HCP than LCP. If urea was removed from all diets, the LCP diets would have - 64 g/d RDP balance
202 and the HCP diets would have + 145 g/d RDP balance. The predicted flow of microbial protein did not
203 differ. The MP balance (g/d) was positive in all treatments, higher on HCP than LCP, and was increased
204 by RPM only on LCP. The predicted flows of all essential digestible AA (g/d) were higher with HCP
205 than LCP, except for the flow of digestible histidine. The predicted flow of digestible Met was 47.1 g/d
206 on CTL and 58.5 g/d on RPM. Diet LCP had more Lys in MP than HCP (6.41 vs 6.32 % of MP). Diets
207 HCP had lower Met in MP than LCP (1.79 vs 1.97 % of MP) and RPM was higher than CTL (2.19 vs
208 1.79 % of MP). The Lys/Met in MP was lower on LCP than HCP (3.21 vs 3.24) and lower on RPM than
209 CTL (2.90 vs 3.54). All diets had positive net energy balance.

210 Rumen microbial yield, the total tract apparent digestibility of nutrients, and plasma glucose
211 concentration are in Table 5. Plasma glucose was reduced when RPM supplemented diet LCP and was
212 increased when RPM supplemented HCP. Rumen microbial yield and efficiency were higher on HCP
213 than LCP and did not differ between RPM and CTL. The supplementation with RPM increased the
214 digestibility of NDF and OM, but had no effect on digestible OM intake. The RPM increased starch
215 digestibility only when it supplemented diet HCP. High protein diets increased the volume of urine.

216 Milk and plasma urea-N and the partitioning of N intake are in Table 6. High protein diets
217 increased MUN (15.6 vs 11.8 mg/dL) and PUN (17.1 vs 13.3 mg/dL) relative to LCP. The concentration
218 of PUN during the day was highest on the HCP diets most of the time (Figure 1). Relative to LCP, the
219 HCP diets increased the flow (g/d) of N in milk and urine, did not affect fecal N flow, reduced the
220 proportion of dietary N in milk (26.0 vs 29.3 % of N intake), increased the proportion in urine (27.9 vs
221 23.4 % of N intake), and tended to reduce the proportion in feces (26.0 vs 28.5 % of N intake). The
222 supplementation of RPM had no effect on urea-N in plasma and milk or the partitioning of N intake.

223 The plasma concentration of AA is in Table 7. The variation in diet protein content had no effect
224 on plasma AA concentration. The supplementation of RPM increased the concentration of Met in plasma

225 (37 vs 16 $\mu\text{mol/L}$), reduced Lys/Met (3.05 vs 6.45), and tended to increase the total of essential AA
226 (1044 vs 925 $\mu\text{mol/L}$), Lys (111 vs 98 $\mu\text{mol/L}$), and Arg (132 vs 120 $\mu\text{mol/L}$). A significant interaction
227 between protein and methionine was detected for the sum of Ile, Leu, and Val. The branched chain AA
228 were increased by RPM only when RPM supplemented diet HCP. Trends for interactions between
229 protein and methionine were also detected for His and Leu. Similarly to the branched chain AA, these
230 AA were increased by RPM only when RPM supplemented the HCP diet.

231

DISCUSSION

232 Although diets LCP and HCP differed in RDP and RUP concentrations in DM, the RDP balance
233 was positive, indicating that both diets theoretically supplied sufficient N relative to the energy available
234 for rumen microbial growth. In addition to the difference in RDP and RUP supply, a difference between
235 the diets was the proportion of RDP from true protein. According to the NRC (2001) dairy model
236 prediction, the RDP requirement was partly supplied by CP from urea in the LCP diets, while in the
237 HCP diets the RDP requirement was totally supplied by true protein and urea CP was in excess of the
238 RDP requirement. Although the model did not predict differences between diets in MP flow from rumen
239 microbes, the relative rumen microbial yield evaluated by the excretion of allantoin in urine was reduced
240 by LCP. The lower supply of peptides and AA to the rumen may explain the reduction in rumen
241 microbial yield induced by LCP (Argyle and Baldwin, 1989; Griswold et al., 1996), since the MUN
242 concentration around 12 mg/dL does not suggest that N availability was limiting rumen microbial
243 growth in the LCP diets (Boucher et al., 2007) and there was no evidence for a reduction in diet
244 digestibility in response to the variation in diet protein content.

245 The flow of total MP was supposedly higher on HCP than LCP, both from rumen microbes and
246 from RUP, probably explaining the greater yield and concentration of milk protein and casein in HCP.
247 Dry matter intake, milk yield, and fat and lactose yield and concentration were not affected by protein
248 in the diet. Reducing the CP content of the diet from 17.1 to 15.5% of DM also did not affect DMI and
249 milk yield in the study of Kalscheur et al. (2006), although Broderick and Reynal (2009) observed lower
250 DMI and milk yield when the CP content of the diet was decreased from 17.1 to 15.8% of DM. Although
251 diet CP is known to be a poor descriptor of the protein profile of the diet, low CP diets seemed to work
252 as well as high CP diets in this experiment, if the secretion of milk protein is not a financial concern.

253 The LCP diets did not penalize DMI and milk yield, but reduced milk protein synthesis by -43.5 g/d
254 and milk protein content by -0.08 %-units.

255 Plasma AA concentration did not differ between protein levels, suggesting that the increased
256 flow of metabolizable AA in diets HCP was used for milk protein synthesis and body tissues and did
257 not affect the synthesis of other milk components in the mammary gland. An increase in absorbed AA
258 was expected to up-regulate the synthesis of fat and lactose in milk, in addition to milk protein synthesis
259 (Apelo et al., 2014b; Osorio et al., 2016), but we did not detect an effect of the protein in the diet on
260 milk total solids yield or concentration. The efficiency of MP usage for lactation [(Milk CP / (MP
261 supplied – MP maintenance))] was 67.9% for LCP and 63.8% for HCP ($P < 0.01$ for protein, $P = 0.24$
262 for methionine, and $P = 0.17$ for the interaction of protein and methionine). The mean efficiency of MP
263 usage for lactation was 65.9%, reasonably close to the 67% efficiency adopted by the NRC (2001) dairy
264 model. This efficiency was calculated assuming model predicted bacterial MP flow (Table 4). However,
265 the efficiency of MP usage for lactation may have been further reduced in diet HCP, since measured
266 rumen microbial yield was increased in this diet. The marginal efficiency of the additional MP supply
267 in diet HCP was apparently lower than the efficiency of MP usage of diet LCP. This result paralleled
268 others that demonstrated that increase diet MP supply reduces MP efficiency use for milk protein
269 synthesis (Lapierre et al., 2007; Raggio et al., 2004).

270 As expected (Huhtanen and Hristov, 2009; Yan et al., 2006), MNE was higher on LCP than
271 HCP (29.3 vs 27.3% of N intake), a $+2$ %-unit difference. The flow of N in feces was not affected by
272 treatments. Endogenous protein contributes proportionally more to fecal N loss than undigested feed
273 protein, since the digestibility of protein in feeds is normally high (Huhtanen et al., 2008). This similarity
274 in fecal N flow is in agreement with the similarity in DMI among diets, since endogenous N is known
275 to be directly related to intake (NRC, 2001; Spek et al., 2013). As CP intake was reduced by LCP, the
276 proportion of N intake going to feces tended to be increased in this diet. The high protein diets increased
277 the flow of N in milk and urine, reduced MNE, and increased urine N as a proportion of N intake ($+4.5$
278 %-units). This is consistent with the increase induced by HCP on MUN and PUN. Diet HCP also
279 increased urine volume by $+23\%$, having implications on manure storage and handling and the negative
280 impact of dairying on the environment (Castillo et al., 2000).

281 There was no effect of RPM on DMI and the yields of milk and milk components. The trend for
282 increased milk fat concentration in response to RPM supplementation has been reported by others (Chen
283 et al., 2011; Zanton et al., 2014), and has been related to the effect of methionine on ruminal
284 biohydrogenation of unsaturated fatty acids, as demonstrated for a methionine precursor (Baldin et al.,
285 2018, 2019), or to the nutrigenomic effect of absorbed AA on fat synthesis in the mammary gland
286 (Laplante and Sabatini, 2009; Li et al., 2019; Osorio et al., 2016). Milk lactose concentration was
287 reduced by RPM and this observation could not be associated to the variation in plasma glucose
288 concentration, but milk total solids concentration was increased by RPM.

289 There was no interaction between protein and methionine for DMI and lactation performance,
290 except for the concentration of protein and casein in milk. The contents of protein and casein in milk
291 were increased by RPM only when RPM supplemented diet HCP. Both the concentration and the yield
292 of milk protein have been used to define the optimum concentration of methionine and lysine in MP for
293 dairy cows (Schwab et al., 2004). Considering that the concentration of protein in milk is a reasonable
294 marker of diet AA adequacy, the increase in milk protein concentration suggests that RPM elicited a
295 positive milk protein response, and hence affected the flow or pattern of metabolizable AA, only when
296 there was high MP supply. This observation is in agreement with the meta-analysis of Leão et al. (2017)
297 and Robinson (2010), both suggesting that the marginal response to RPM supplementation is higher in
298 high than in low protein diets. Although RPM can increase milk protein secretion in low protein diets,
299 the positive response can be of small magnitude (Sinclair et al., 2014), as was observed in this
300 experiment. However, Leonardi et al. (2003) did not observe any interaction between protein and RPM
301 supplementation to diets with 16.1 and 18.8% CP in DM, suggesting that the lowest CP content may
302 have not be low enough to interact with RPM supplementation in that experiment.

303 The marginal efficiency of converting MP from RPM to milk protein concentration was
304 calculated assuming that Smartamine supplied 10.14 g/d of MP when added to diet LCP and 11.94 g/d
305 of MP when added to diet HCP. Efficiencies were: 0.0059 %-unit/g of RPM MP in LCP (+ 0.06/10.14)
306 and 0.0100 %-unit/g of RPM MP in HCP (+ 0.12/11.94). The mean efficiency of converting RPM MP
307 to milk protein yield in diet HCP was 2.17 g/g of RPM MP (+ 22/10.14). These results were similar to
308 those reviewed by Zanton et al. (2014), who calculated a mean increase of 19 g/d for milk protein yield

309 in response to Smartamine supplementation and a marginal efficiency of 2.23 g of milk protein/g of
310 Smartamine MP. The most profitable utilization of RPM was on diet HCP, questioning the assumption
311 that better AA profile of MP would allow for a reduction in diet CP content.

312 Trends for the interactions between protein and methionine were detected for plasma glucose
313 concentration and for the total tract starch digestibility. Both variables were increased by RPM only in
314 diet HCP, and glucose concentration was reduced by RPM on LCP. Increased glucose availability to the
315 mammary gland may have spared the use of AA as energy sources (Doepel and Lapierre, 2010) when
316 RPM supplemented HCP, a plausible mechanism for the observed increase in milk protein
317 concentration. Gil et al. (1973) reported an increase in in vitro starch digestibility with DL-methionine
318 when ammonia was the only source of N. Increased proportion of propionate in rumen fluid was
319 observed in dairy cows supplemented with RPM (Munneke et al., 1991). Pancreatic amylase secretion
320 (Richards et al., 2003), small intestine starch digestion (Richards et al., 2002), and portal glucose
321 absorption (Taniguchi et al., 1995) can also be increased by greater post ruminal flow of protein and AA
322 in cattle (Brake et al., 2014a, 2014b; Liu et al., 2015). These are plausible mechanism for the increase
323 in starch digestibility and plasma glucose concentration when RPM was added to HCP.

324 The supplementation of RPM increased the total tract NDF digestibility in both diets, but energy
325 intake evaluated by DOMI did not differ. The reduction in rumen microbial yield induced by diet LCP
326 did not reduce the total tract NDF digestibility, suggesting that the effect of methionine on NDF
327 digestibility may have been modulated by action on rumen microbial diversity instead of rumen
328 microbial yield. Noftsgger et al. (2005) supplemented DL-methionine to dairy cows and observed an
329 increase in rumen NDF digestibility, but there was no effect on microbial protein flow. Holter et al.
330 (1972) also observed an increase in total tract NDF digestibility with methionine precursor
331 supplementation of lactating cows. It has been shown that ruminal fibrolytic bacteria can benefit from
332 amino acids (Bach et al., 2005). Atasoglu et al. (2001) demonstrated that cellulolytic bacteria such as
333 *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, and *Ruminococcus albus* reduced the
334 incorporation of N from ammonia when the concentration of amino acids in fermenters was increased.
335 The supplementation of methionine precursors (Martin et al., 2013) and RPM (Abdelmegeid et al., 2018)
336 increased in the density of *Fibrobacter succinogenes* in rumen fluid in vivo. Increased NDF digestibility

337 is a plausible effect of the partial availability of methionine from RPM products to the rumen
338 fermentation.

339 Plasma methionine concentration was increased and the lysine to methionine ratio was
340 drastically reduced by RPM supplementation of diets LCP and HCP, which is consistent with the
341 literature (Ordway et al., 2009; Rulquin and Delaby, 1997; Zang et al., 2017). The RPM also tended to
342 increase arginine, lysine and the total of essential AA in plasma. Plasma methionine concentration was
343 a reasonable marker of digestible methionine supply from RPM.

344 Interactions between protein and methionine were detected for histidine, leucine, and the sum
345 of the branched chain AA. Increases in plasma concentration of these AA were observed only when
346 RPM was added to HCP, in agreement with the response in milk protein concentration to RPM supply.
347 Leucine and isoleucine have mTOR stimulating properties in the mammary gland (Apelo et al., 2014a;
348 Appuhamy et al., 2012; Zhou et al., 2018), while histidine has substrate driven requirement for milk
349 protein synthesis (Giallongo et al., 2016; Lee et al., 2012b). The RPM supplementation increased the
350 plasma concentration of branched chain AA in blood serum of dairy cows (Casper et al., 1987), but this
351 effect was not observed when DL-methionine was infused into the duodenum (Guinard and Rulquin,
352 1995; Pisulewski et al., 1996), suggesting a possible effect of methionine on rumen AA metabolism.
353 Bach and Stern (1999) showed in a continuous culture system that a high supply of methionine reduced
354 the degradation of leucine in rumen fluid. Similarly, Velle et al. (1997) observed that the infusion of
355 increasing doses of methionine into the rumen of non-lactating cows increased the concentrations of
356 leucine, valine, histidine, arginine and to a lesser extent isoleucine in rumen fluid. These results are
357 consistent with the increase in net splanchnic flow of isoleucine and leucine in response to RPM
358 supplementation (Berthiaume et al., 2006). The positive milk protein response to RPM apparently
359 involved the action of other AA, in addition to methionine.

360

CONCLUSIONS

361 The high protein diet increased milk protein yield and concentration, reduced the efficiency of
362 N usage for lactation, and increased the proportion of dietary N excreted in urine. Rumen microbial
363 yield was reduced on low protein, but the total tract digestibility of nutrients did not differ. Plasma AA

364 concentration did not reflect the change in diet protein profile. The consideration of the ruminal
365 requirement for true protein may favor rumen function when low protein diets are adopted.

366 The supplementation of RPM to the high protein diet increased milk protein concentration, the
367 total tract starch digestibility, plasma glucose concentration, and the concentrations of branched chain
368 AA and histidine in plasma, suggesting that RPM supplementation was more effective on the high
369 protein diet. Plasma methionine concentration was increased by RPM, as well as lysine and arginine,
370 independently of dietary protein content. The supplementation of RPM did not affect the partitioning of
371 diet N into, milk, urine and feces.

372 ACKNOWLEDGMENTS

373 The authors are grateful to CNPq (Brasilia, Brazil) and Fapemig (Belo Horizonte, Brazil) for
374 the grant to the authors, to Adisseo South America (São Paulo, Brazil) for partially funding the project
375 and to the members of Grupo do Leite of the University of Lavras for the help in data collection and
376 animal care.

377 REFERENCES

- 378
- 379 Abdelmegeid, M.K., Elolimy, A.A., Zhou, Z., Lopreiato, V., McCann, J.C., Loor, J.J., 2018.
380 Rumen-protected methionine during the peripartal period in dairy cows and its effects on
381 abundance of major species of ruminal bacteria. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9, 17.
382 <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0230-8>.
- 383 Apelo, S.I.A., Knapp, J.R., Hanigan, M.D., 2014b. Invited review: current representation and
384 future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.*
385 97 (7), 4000-4017. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7392>.
- 386 Apelo, S.I.A., Singer, L.M., Lin, X.Y., McGilliard, M.L., St-Pierre, N.R., Hanigan, M.D.,
387 2014a. Isoleucine, leucine, methionine, and threonine effects on mammalian target of
388 rapamycin signaling in mammary tissue. *J. Dairy Sci.* 97 (2), 1047-1056.
389 <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7348>.
- 390 Appuhamy, J.A.D.R.N., Knoebel, N.A., Nayananjalie, W.A.D., Escobar, J., Hanigan, M.D.,
391 2012. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis

- 392 in MAC-T Cells and bovine mammary tissue slices. *J. Nutr.* 142, 484–491.
393 <https://doi.org/10.3945/jn.111.152595>.
- 394 Argyle, J.L., Baldwin, R.L., 1989. Effects of amino acids and peptides on rumen microbial
395 growth yields. *J. Dairy Sci.* 72 (8), 2017-2027. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-
396 0302\(89\)79325-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79325-5).
- 397 Association of Official Agricultural Chemists, 1975. *Official Methods of Analysis: Volume 1,*
398 *twelfth ed.* Washington, DC, AOAC.
- 399 Association of Official Agricultural Chemists, 1990. *Official Methods of Analysis: Volume 1,*
400 *fifteenth ed.* Arlington, AOAC.
- 401 Association of Official Agricultural Chemists, 2012. *Official Methods of Analysis, nineteenth*
402 *ed.* Rockville, MD: AOAC.
- 403 Atasoglu, C., Newbold, C.J., Wallace, R.J., 2001. Incorporation of [15N] ammonia by the
404 cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and
405 *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Appl. Environ. Microbio.* 67 (6), 2819–2822.
406 <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2819-2822.2001>.
- 407 Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D., 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*
408 88 (Suppl 1), 9-21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73133-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7).
- 409 Bach, A., Stern, M.D., 1999. Effects of different levels of methionine and ruminally
410 undegradable protein on the amino acid profile of effluent from continuous culture
411 fermenters. *J. Anim. Sci.* 77 (12), 3377-3384. <https://doi.org/10.2527/1999.77123377x>.
- 412 Baldin, M., Tucker, H.A., Harvatine, K.J., 2019. Milk fat response and milk fat and urine
413 biomarkers of microbial nitrogen flow during supplementation with 2-hydroxy-4-
414 (methylthio)butanoate. *J. Dairy Sci.* 102 (7), 6157-6166. [https://doi.org/10.3168/jds.2018-
415 15031](https://doi.org/10.3168/jds.2018-15031).
- 416 Baldin, M., Zanton, G.I., Harvatine, K.J., 2018. Effect of 2-hydroxy-4-(methylthio)butanoate
417 (HMTBa) on risk of biohydrogenation-induced milk fat depression. *J. Dairy Sci.* 101 (1),
418 376-385. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13446>.

- 419 Berthiaume, R., Thivierge, M.C., Patton, R.A., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B.W.,
420 Lapiere, H., 2006. Effect of ruminally protected methionine on splanchnic metabolism of
421 amino acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89 (5), 1621-1634.
422 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72229-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72229-9).
- 423 Boucher, S.E., Ordway, R.S., Whitehouse, N.L., Lundy, F.P., Kononoff, P.J., Schwab, C.G.,
424 2007. Effect of incremental urea supplementation of a conventional corn silage-based diet
425 on ruminal ammonia concentration and synthesis of microbial protein. *J. Dairy Sci.* 90 (12),
426 5619-5633. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0012>.
- 427 Brake, D.W., Titgemeyer, E.C., Anderson, D.E., 2014b. Duodenal supply of glutamate and
428 casein both improve intestinal starch digestion in cattle but by apparently different
429 mechanisms. *J. Anim. Sci.* 92 (9), 4057-4067. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7909>.
- 430 Brake, D.W., Titgemeyer, E.C., Bailey, E.A., Anderson, D.E., 2014a. Small intestinal digestion
431 of raw cornstarch in cattle consuming a soybean hull-based diet is improved by duodenal
432 casein infusion. *J. Anim. Sci.* 92 (9), 4047-4056. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-7908>.
- 433 Broderick, G.A., Reynal, S.M., 2009. Effect of dietary protein concentration and degradability
434 on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92 (6),
435 2719-2728. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1277>.
- 436 Broderick, G.A., Stevenson, M.J., Patton, R.A., Lobos, N.E., Colmenero, J.J.O., 2008. Effect
437 of supplementing rumen-protected methionine on production and nitrogen excretion in
438 lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91 (3), 1092-1102. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0769>.
- 440 Calder, A.G., Garden, K.E., Anderson, S.E., Lobley, G.E., 1999. Quantitation of blood and
441 plasma amino acids using isotope dilution electron impact gas chromatography/mass
442 spectrometry with U-¹³ C amino acids as internal standards. *Rapid Commun. Mass*
443 *Spectrom.* 13 (21), 2071-2227. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19991115\)13:21<2080::AID-RCM755>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19991115)13:21<2080::AID-RCM755>3.0.CO;2-O).
- 445 Casper, D. P., Schingoethe, D.J., Yang, C.-M.J., Mueller, C.R., 1987. Protected methionine
446 supplementation with extruded blend of soybeans and soybean meal for dairy cows. *J.*
447 *Dairy Sci.* 70 (2), 321-330. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)80013-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)80013-9).

- 448 Castillo, A.R., Kebreab, E., Beever, D.E., France, J., 2000. A review of efficiency of nitrogen
449 utilisation in lactating dairy cows and its relationship with environmental pollution. *J.*
450 *Anim. Feed Sci.* 9 (1), 1-32. <https://doi.org/10.22358/jafs/68025/2000>.
- 451 Chen, X.B., Gomes, M.J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle
452 based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details.
453 *Proceedings of the International Feed Resources Unit, Aberdeen.*
- 454 Chen, Z.H., Broderick, G.A., Luchini, N.D., Sloan, B.K., Devillard, E., 2011. Effect of feeding
455 different sources of rumen-protected methionine on milk production and N-utilization in
456 lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94 (4), 1978-1988. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3578>.
- 458 Doepel, L., Lapierre, H., 2010. Changes in production and mammary metabolism of dairy cows
459 in response to essential and nonessential amino acid infusions. *J. Dairy Sci.* 93 (7), 3264-
460 3274. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-3033>.
- 461 Fadul-Pacheco, L., Pellerin, D., Chouinard, P.Y., Wattiaux, M.A., Duplessis, M., Charbonneau,
462 E., 2017. Nitrogen efficiency of eastern Canadian dairy herds: effect on production
463 performance and farm profitability. *J. Dairy Sci.* 100 (8), 1-10.
464 <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11788>.
- 465 Fox, D.G., Tedeschi, L.O., Tylutki, T.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., Chase, L.E., Pell,
466 A.N., Overton, T.R., 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for
467 evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112 (1-4), 29-
468 78. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.10.006>.
- 469 Giallongo, F., Harper, M.T., Oh, J., Lopes, J.C., Lapierre, H., Patton, R.A., Parys, C., Shinzato,
470 I., Hristov, A.N., 2016. Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on
471 lactation performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 99 (6), 4437-4452.
472 <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10822>.
- 473 Gil, L. A., Shirley, R. L., Moore, J. E., 1973. Effect of methionine hydroxy analog on bacterial
474 protein synthesis from urea and glucose, starch or cellulose by rumen microbes, in vitro. *J.*
475 *Anim. Sci.* 37 (1), 159-163. <https://doi.org/10.2527/jas1973.371159x>.

- 476 Graulet, B., Richard, C., Robert, J. C., 2005. Methionine availability in plasma of dairy cows
477 supplemented with methionine hydroxy analog isopropyl ester. *J. Dairy Sci.* 88 (10), 3640-
478 3649. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73049-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73049-6).
- 479 Griswold, K.E., Hoover, W.H., Miller, T.K., Thayne, W.V., 1996. Effect of form of nitrogen
480 on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 74 (2), 483-491.
481 <https://doi.org/10.2527/1996.742483x>.
- 482 Guinard, J., Rulquin, H., 1995. Effects of graded amounts of duodenal infusions of methionine
483 on the mammary uptake of major milk precursors in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 78 (10),
484 2196-2207. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76847-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76847-3).
- 485 Hall, M.B., 2009. Determination for starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds:
486 a comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. *J.*
487 *Assoc. Anal. Chem.* 92 (1), 42-49. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.42>.
- 488 Holter, J.B., Kim, C.W., Colovos, N.F., 1972. Methionine hydroxy analog for lactating dairy
489 cows. *J. Dairy Sci.* 55 (4), 460-465. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(72\)85516-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(72)85516-4).
- 490 Hristov, A.N., Harper, M., Oh, J., Giallongo, F., Lopes, J.C., Cudoc, G., Clay, J., Ward, R.,
491 Chase, L.E., 2018. Short communication: variability in milk urea nitrogen and dairy total
492 mixed ration composition in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 101 (2), 1579-
493 1584. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12925>.
- 494 Huhtanen, P., Hristov, A.N., 2009. A meta-analysis of the effects of dietary protein
495 concentration and degradability on milk protein yield and milk N efficiency in dairy cows.
496 *J. Dairy Sci.* 92 (7), 3222-3232. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1352>.
- 497 Huhtanen, P., Nousiainen, J.I., Rinne, M., Kytölä, K., Khalili, H., 2008. Utilization and partition
498 of dietary nitrogen in dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 91 (9), 3589-
499 3599. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1181>.
- 500 Ipharraguerre, I.R., Clark, J.H., 2005. Varying protein and starch in the diet of dairy cows. II.
501 Effects on performance and nitrogen utilization for milk production. *J. Dairy Sci.* 88 (7),
502 2556-2570. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72932-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72932-5).

- 503 Kalscheur, K.F. Baldwin, R.L., Glenn, B.P., Kohn, R.A., 2006. Milk production of dairy cows
504 fed differing concentrations of rumen-degraded protein. *J. Dairy Sci.* 89 (1), 249-259.
505 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72089-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72089-6).
- 506 Lammers, B.P., Buckmaster, D.R., Heinrichs, A.J., 1996. A simple method for the analysis of
507 particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79 (5), 922-928.
508 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76442-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1).
- 509 Lapierre, H., Lobley, G., Ouellet, D., Doepel, L., Pacheco, D., 2007. Amino acid requirements
510 for lactating dairy cows: reconciling predictive models and biology. *Proceedings of Cornell*
511 *Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, Ithaca, NY.
- 512 Laplante, M., Sabatini, D.M., 2009. An emerging role of mtor in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.*
513 19 (22), R1046–R1052. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.09.058>.
- 514 Leão, G.F.M., Dórea, J.R.R., Danés, M.A.C., 2017. Factors affecting performance responses to
515 supplementation of rumen-protected methionine for dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100 (Suppl.
516 2), 93-94. Abstract M239. <https://m.adsa.org/2017/abs/t/70569>. (accessed 22 Oct 2022).
- 517 Lee, C., Hristov, A.N., Heyler, K.S., Cassidy, T.W., Lapierre, H., Varga, G.A., Parys, C., 2012a.
518 Effects of metabolizable protein supply and amino acid supplementation on nitrogen
519 utilization, milk production, and ammonia emissions from manure in dairy cows *J. Dairy*
520 *Sci.* 95 (9), 5253-5268. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5366>.
- 521 Lee, C., Hristov, N., Cassidy, T.W., Heyler, K.S., Lapierre, H., Varga, G.A., Veth, M.J., Patton,
522 R.A., Parys, C., 2012b. Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk
523 protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet. *J. Dairy Sci.* 95 (10),
524 6042-6056. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5581>.
- 525 Leonardi, C., Stevenson, M., Armentano, L. E., 2003. Effect of two levels of crude protein and
526 methionine supplementation on performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86 (12), 4033-
527 4042. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74014-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74014-4).
- 528 Lessa, A.C.R., Madari, B.E., Paredes, D.S., Boddey, R.M., Urquiaga, S., Jantalia, C.P., Alves,
529 B.J.R., 2014. Bovine urine and dung deposited on Brazilian savannah pastures contribute
530 differently to direct and indirect soil nitrous oxide emissions. *Agric. Ecosyst. Environ.* 190,
531 104-111. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.01.010>.

- 532 Li, P., Zhou, C., Li, X., Yu, M., Li, M., Gao, X., 2019. CRT2 is a key mediator of amino acid-
533 induced milk fat synthesis in mammary epithelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 67 (37),
534 10513-10520. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b04648>.
- 535 Liu, K., Liu, Y., Liu, S.M., Xu, M., Yu, Z.P., Wang, X., Cao, Y.C., Yao, J.H., 2015.
536 Relationships between leucine and the pancreatic exocrine function for improving starch
537 digestibility in ruminants. *J. Dairy Sci.* 98 (4), 2576–2582.
538 <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8404>.
- 539 Martin, C., Mirande, C., Morgavi, D.P., Forano, E., Devillard, E., Mosono, P., 2013.
540 Methionine analogues HMB and HMBi increase the abundance of cellulolytic bacterial
541 representatives in the rumen of cattle with no direct effects on fibre degradation. *Anim.*
542 *Feed. Sci. Technol.* 182 (1-4), 16-24. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.03.008>.
- 543 Munneke, R. L., Schingorhe, D. J., Casper, D. P., 1991. Lactational evaluation of ruminally
544 protected methionine in diets containing extruded soybeans and urea. *J. Dairy Sci.* 74 (1),
545 227-233. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78164-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78164-2).
- 546 National Research Council (NRC), 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, seventh ed.
547 Washington, DC, National Academy of Sciences.
- 548 Noftsker, S., St-Pierre, N.R., Sylvester, J.T., 2005. Determination of rumen degradability and
549 ruminal effects of three sources of methionine in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 88 (1), 223-
550 237. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72680-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72680-1).
- 551 Olmos Colmenero, J. J., Broderick, G.A., 2006. Effect of amount and ruminal degradability of
552 soybean meal protein on performance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89 (5), 1635-
553 1643. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72230-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72230-5).
- 554 Ordway, R.S., Boucher, S.E., Whitehouse, N.L., Schwab, C.G., Sloan, B.K., 2009. Effects of
555 providing two forms of supplemental methionine to periparturient Holstein dairy cows on
556 feed intake and lactational performance. *J. Dairy Sci.* 92 (10), 5154-5166.
557 <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2259>.
- 558 Osorio, J.S., Lohakare, J., Bional, M., 2016. Biosynthesis of milk fat, protein, and lactose: roles
559 of transcriptional and posttranscriptional regulation. *Physiol. Genomics* 48 (4), 231-256.
560 <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00016.2015>.

- 561 Pereira, M.N., Morais Júnior, N.N., Oliveira, R.C., Salvati, G.G.S., Pereira, R.A.N., 2021.
562 Methionine precursor effects on lactation performance of dairy cows fed raw or heated
563 soybeans. *J. Dairy Sci.* 104 (3), 2996-3007. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18696>.
- 564 Pisulewski, P.M., Rulquin, H., Peyraud, J.L., Verite, R., 1996. Lactational and systemic
565 responses of dairy cows to postruminal infusions of increasing amounts of methionine. *J.*
566 *Dairy Sci.* 79 (10), 1781-1791. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76546-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76546-3).
- 567 Raggio, G., Pacheco, D., Berthiaume, R., Lobley, G.E., Pellerin, D., Allard, G., Dubreuil, P.,
568 Lapiere, H., 2004. Effect of level of metabolizable protein on splanchnic flux of amino
569 acids in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87 (10), 3461-3472.
570 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73481-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73481-5).
- 571 Richards, C.J., Franco, A.F., Bohnert, D.W., Huntington, G.B., Macari, M., Harmon, D.L.,
572 2002. Intestinal starch disappearance increased in steers abomasally infused with starch
573 and protein. *J. Anim. Sci.* 80 (12), 3361-3368. <https://doi.org/10.2527/2002.80123361x>.
- 574 Richards, C.J., Swanson, K.C., Paton, S.J., Harmon, D.L., Huntington, G.B., 2003. Pancreatic
575 exocrine secretion in steers infused postruminally with casein and cornstarch. *J. Anim. Sci.*
576 81 (4), 1051-1056. <https://doi.org/10.2527/2003.8141051x>.
- 577 Robinson, P.H., 2010. Impacts of manipulating ration metabolizable lysine and methionine
578 levels on the performance of lactating dairy cows: a systematic review of the literature.
579 *Livest. Sci.* 127 (2-3), 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.10.003>.
- 580 Rotz, C. A., Satter, L.D., Mertens, D.R., Muck, R.E., 1999. Feeding strategy, nitrogen cycling,
581 and profitability of dairy farms. *J. Dairy Sci.* 82 (12), 2841-2855.
582 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75542-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75542-6).
- 583 Rulquin, H., Delaby, L., 1997. Effects of the energy balance of dairy cows on lactational
584 responses to rumen-protected methionine. *J. Dairy Sci.* 80 (10), 2513-2522.
585 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76204-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76204-0).
- 586 Rulquin, H., Kowalczyk, J., 2003. Development of a method for measuring lysine and
587 methionine bioavailability in rumen-protected products for cattle. *J. Anim. Feed Sci.* 12
588 (3), 465-474. <https://doi.org/10.22358/jafs/67723/2003>.

- 589 Schwab, C.G., Ordway, R.S., Whitehouse, N.L., 2004. Amino acid balancing in the context of
590 mp and RUP requirements. Proceedings of the Florida Ruminant Nutrition Symposium,
591 Gainesville.
- 592 Sinclair, K.D., Garnsworthy, P.C., Mann, G.E., Sinclair, 2014. Reducing dietary protein in
593 dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility.
594 *Animal* 8 (2), 262-274. <https://doi.org/10.1017/S1751731113002139>.
- 595 Spek, J.W., Dijkstra, J., Van Duinkerken, G., Hendriks, W.H., Bannink, A., 2013. Prediction
596 of urinary nitrogen and urinary urea nitrogen excretion by lactating dairy cattle in
597 northwestern Europe and North America: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96 (7), 4310-4322.
598 <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6265>.
- 599 Taniguchi, K., Huntington, G.B., Glenn, B.P., 1995. Net nutrient flux by visceral tissues of beef
600 steers given abomasal and ruminal infusions of casein and starch. *J. Dairy Sci.* 73 (1), 236-
601 249. <https://doi.org/10.2527/1995.731236x>.
- 602 Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent
603 fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 (10),
604 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).
- 605 Velle, W., Sjaastad, Ø.V., Aulie, A., Grønset, D., Feigenwinter, K., Framstad, T., 1997. Rumen
606 escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal
607 administration to cows. *J. Dairy Sci.* 80 (12), 3325-3332.
608 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76308-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76308-2).
- 609 Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Boman, R.L., Troutt Jr., H.F., Lesch, T.N., 1982.
610 A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production
611 characteristics. *J. Dairy Sci.* 65 (3), 495-501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-
612 0302\(82\)82223-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6).
- 613 Yan, T., Frost, J.P., Agnew, R.E., Binnie, R.C., Mayne, C.S., 2006. Relationships among
614 manure nitrogen output and dietary and animal factors in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*
615 89 (10), 3981-3991. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72441-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72441-9).
- 616 Zang, Y., Samii, S.S., Phipps, Z.C., Tager, L.R., McFadden, J.W., Krause, K.M., 2017.
617 Comparative effects of multiple sources of rumen-protected methionine on milk production

- 618 and serum amino acid levels in mid-lactation dairy cows. *Prof. Anim. Sci.* 33 (6), 692–699.
619 <https://doi.org/10.15232/pas.2017-01641>.
- 620 Zanton, G.I., Bowman, G.R., Vázquez-Añón, M., Rode, L.M., 2014. Meta-analysis of lactation
621 performance in dairy cows receiving supplemental dietary methionine sources or
622 postruminal infusion of methionine. *J. Dairy Sci.* 97 (11), 7085-7101.
623 <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8220>.
- 624 Zhou, Y., Zhou, Z., Peng, J., Loor, J.J., 2018. Methionine and valine activate the mammalian
625 target of rapamycin complex 1 pathway through heterodimeric amino acid taste receptor
626 (TAS1R1/TAS1R3) and intracellular Ca²⁺ in bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy*
627 *Sci.* 101 (12), 11354-11363. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14461>.

628 **Table 1.** Feeds composition (% of DM). Mean \pm standard deviation of 4 samples.

	Corn silage	Corn grain	Citrus pulp	Soybean meal	Whole cottonseeds	Smartamine
DM ¹	37.9 \pm 2.1	89.4 \pm 0.3	88.3 \pm 0.4	91.5 \pm 0.7	93.2 \pm 0.4	99.6 \pm 0.1
CP ¹	9.4 \pm 1.3	9.1 \pm 1.2	7.7 \pm 0.6	53.4 \pm 5.5	23.2 \pm 2.5	76.9 \pm 3.3
NDF ¹	44.4 \pm 3.3	14.6 \pm 2.1	22.7 \pm 0.7	12.5 \pm 1.5	47.9 \pm 1.7	
EE ¹	3.5 \pm 0.2	4.2 \pm 0.3	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.1	19.3 \pm 0.4	19.4 \pm 3.8
Ash	3.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	5.8 \pm 0.4	7.4 \pm 0.1	4.0 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1
Starch	35.7 \pm 2.1	63.7 \pm 2.8	8.6 \pm 0.7	8.6 \pm 0.7	2.0 \pm 0.1	

629 ¹ DM = Dry matter % as-fed. CP = Crude protein. NDF = Neutral detergent fiber. EE = Ether extract.

630 **Table 2.** Composition and particle size distribution of the total mixed ration with low (LCP)
 631 and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine

	LCP		HCP	
	CTL	RPM	CTL	RPM
	% of dry matter			
Corn silage	49.48	49.42	49.51	49.46
Finely ground corn	14.91	14.91	14.90	14.89
Soybean meal	10.62	10.61	14.02	14.01
Citrus pulp	12.68	12.68	9.26	9.25
Whole cottonseeds	9.83	9.83	9.83	9.82
Urea	0.24	0.24	0.24	0.24
Premix ¹	2.25	2.25	2.24	2.24
Smartamine		0.07		0.08
Crude protein	15.59	15.57	17.14	17.17
Neutral detergent fiber	33.12	33.00	32.80	32.75
Non-fiber carbohydrates	40.69	40.79	39.41	39.42
Starch	31.57	31.50	31.36	31.35
Ether extract	4.92	4.93	4.92	4.93
Ash	6.33	6.36	6.39	6.39
	% of as-fed			
Dry matter	53.7		53.7	
Feed particles > 19 mm ²	8.6 ± 4.6		8.2 ± 3.9	
Feed particles 8 - 19 mm	59.1 ± 4.8		56.4 ± 1.9	
Feed particles < 8 mm	32.4 ± 6.8		35.4 ± 3.9	

632 ¹Premix: 28% limestone, 35% sodium bicarbonate, 10% magnesium oxide, 9% salt, 18% minerals and
 633 vitamins (25.0% Ca; 15.6% P; 2.6% Mg; 3.1% S; 120 ppm Co; 2,000 ppm Cu; 5,000 ppm Mn; 12,000
 634 ppm Zn; 83 ppm Se; 200 ppm I; 120 ppm F; 800 ppm Fe; 1,000,000 UI/kg Vit. A; 220,000 UI/kg Vit.
 635 D; 6,200 UI/kg Vit. E)

636 ²Penn State Particle Separator. Mean and standard deviation of 64 samples (4/treatment/period)

637

638 **Table 3.** Dry matter intake (DMI), lactation performance, body condition score (BCS), and
 639 body weight (BW) with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL)
 640 rumen protected methionine

	LCP		HCP		SEM ²	P-value ¹		
	CTL	RPM	CTL	RPM		PT	MT	PT×MT
	kg/d							
DMI	24.2	25.1	24.7	24.9	0.68	0.74	0.25	0.32
Milk	37.3	36.6	37.6	37.1	1.18	0.35	0.18	0.88
4% FCM ³	32.5	32.3	32.9	32.8	1.05	0.26	0.74	0.99
ECM ⁴	34.1	33.9	34.7	34.7	0.99	0.14	0.87	0.80
Fat	1.293	1.299	1.309	1.319	0.0437	0.36	0.69	0.94
Protein	1.135	1.134	1.167	1.189	0.0367	< 0.01	0.52	0.47
Casein	0.886	0.887	0.912	0.932	0.0291	< 0.01	0.43	0.45
Lactose	1.709	1.665	1.727	1.685	0.0559	0.49	0.13	0.98
Total solids	4.370	4.324	4.441	4.421	0.1332	0.16	0.58	0.82
	% of milk							
Fat	3.50	3.57	3.48	3.57	0.097	0.83	0.07	0.77
Protein	3.06 ^b	3.12 ^b	3.11 ^b	3.23 ^a	0.064	< 0.01	< 0.01	0.10
Casein	2.39 ^b	2.44 ^b	2.43 ^b	2.53 ^a	0.054	< 0.01	< 0.01	0.10
Lactose	4.61	4.57	4.60	4.56	0.058	0.57	0.04	0.84
Total solids	11.80	11.88	11.82	11.98	0.148	0.14	< 0.01	0.32
BCS, 1 to 5	2.91	2.91	2.85	2.83	0.070	0.13	0.71	0.92
BW, kg	648	641	641	644	13.1	0.39	0.43	0.18

641 ¹ PT = protein, MT = methionine, PT×MT = interaction between PT and MT. Means overwritten by
 642 different letters on a line differ by pair-wise T-test at $P \leq 0.05$

643 ² Standard error of the means

644 ³ 4% fat-corrected milk

645 ⁴ Energy-corrected milk

646

647 **Table 4.** Predicted protein and amino acids (AA) supplies (NRC, 2001) based on actual intake,
 648 cow performance and size, and feed composition during the experiment for treatments with low
 649 (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine

	LCP		HCP		SEM ²	P-value ¹		
	CTL	RPM	CTL	RPM		PT	MT	PT×MT
	% of dry matter							
RDP ³	10.2	10.1	10.9	11.0	0.04	< 0.01	0.92	0.29
RUP ⁴	5.4	5.5	6.1	6.2	0.04	< 0.01	0.52	0.35
	g/d							
RDP balance	95	95	305	306	6.1	< 0.01	0.95	0.94
RDP balance NU ⁵	- 59	- 69	144	146	4.9	< 0.01	0.27	0.16
MP ⁶ bacterial	1283	1324	1315	1316	33.0	0.60	0.26	0.28
MP RUP	1097	1163	1297	1305	41.1	< 0.01	0.16	0.27
MP supplied	2494	2609	2729	2738	75.6	< 0.01	0.20	0.27
MP required	2434	2467	2480	2527	64.7	< 0.01	0.23	0.67
MP balance	60 ^c	152 ^b	249 ^a	211 ^{ab}	46.1	< 0.01	0.40	0.05
d ⁷ Arginine	121.3	126.3	133.1	133.2	3.60	< 0.01	0.25	0.29
d Histidine	61.6	57.3	60.6	60.4	3.60	0.73	0.47	0.50
d Isoleucine	119.8	124.3	129.9	130.0	3.42	< 0.01	0.28	0.31
d Leucine	214.9	223.3	234.1	233.9	6.29	< 0.01	0.30	0.29
d Lysine	160.1	166.3	173.1	173.2	4.49	< 0.01	0.26	0.28
d Methionine	45.5	57.4	48.6	59.5	1.38	< 0.01	< 0.01	0.59
d Phenylalanine	123.7	129.1	135.6	135.8	3.63	< 0.01	0.23	0.26
d Threonine	118.6	123.1	127.8	127.6	3.35	< 0.01	0.31	0.27
d Valine	133.6	139.1	144.6	144.7	3.84	< 0.01	0.25	0.27
d essential AA	1099	1145	1187	1198	32.4	< 0.01	0.14	0.36
	% of MP							
Lysine	6.43	6.38	6.30	6.33	0.028	< 0.01	0.79	0.16
Methionine	1.82	2.20	1.76	2.17	0.009	< 0.01	< 0.01	0.16
Lys/Met	3.52	2.90	3.56	2.91	0.006	< 0.01	< 0.01	0.21
	Mcal/d							
NE _L ⁸ balance	3.3	4.9	4.3	4.3	0.67	0.66	0.12	0.16

- 650 ¹ PT = protein, MT = methionine, PT×MT = interaction between PT and MT. Means overwritten by
651 different letters on a line differ by pair-wise T-test at $P \leq 0.05$
- 652 ² Standard error of the means
- 653 ³ Rumen degradable protein
- 654 ⁴ Rumen undegradable protein
- 655 ⁵ RDP balance excluding urea from the diet
- 656 ⁶ Metabolizable protein
- 657 ⁷ Digestible AA
- 658 ⁸ Net energy for lactation
- 659

660 **Table 5.** Plasma glucose, urinary allantoin (Alla) excretion and total-tract apparent digestibility
 661 (D) of nutrients with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen
 662 protected methionine

	LCP		HCP		SEM ²	P-value ¹		
	CTL	RPM	CTL	RPM		PT	MT	PT×MT
Glucose, ³ mg/dL	72.3 ^a	65.4 ^b	64.1 ^b	71.4 ^a	4.17	0.77	0.96	0.08
DOMI, ⁴ kg	15.4	16.4	15.9	16.3	0.54	0.62	0.13	0.45
Alla, mmol/d	316	299	345	351	34.8	0.01	0.71	0.43
Alla/DOMI, mmol/kg	20.8	18.5	22.5	21.9	1.15	0.03	0.20	0.46
Urine, L	16.3	15.7	19.5	19.9	1.04	< 0.01	0.89	0.59
	% of intake							
DM D ⁵	66.8	69.2	67.9	69.0	0.97	0.61	0.07	0.48
OM D ⁶	68.4	70.8	69.4	70.6	0.94	0.65	0.05	0.48
NDF D ⁷	39.5	44.0	39.9	42.6	1.71	0.75	0.04	0.61
Non-NDF OM D	80.2	81.6	81.4	82.1	0.75	0.24	0.14	0.59
Starch D	94.6 ^{ab}	94.2 ^{ab}	94.0 ^b	95.3 ^a	0.47	0.57	0.37	0.08

663 ¹ PT = protein, MT = methionine, PT×MT = interaction between PT and MT. Means overwritten by
 664 different letters on a line differ by pair-wise T-test at $P \leq 0.05$

665 ² Standard error of the means

666 ³ $P \geq 0.12$ for the effect of sampling time (0, 6, and 12 h post-feeding) and its interactions with PT and
 667 MT

668 ⁴ DOMI = Digestible organic matter intake

669 ⁵ Dry matter

670 ⁶ Organic matter

671 ⁷ Neutral detergent fiber

672

673 **Table 6.** Milk (MUN) and plasma (PUN) urea-N and N in milk, feces, and urine with low (LCP)
 674 and high (HCP) protein, with (RPM) and without (CTL) rumen protected methionine

	LCP		HCP		SEM ²	P-value ¹			
	CTL	RPM	CTL	RPM		PT	MT	PT×MT	
	mg/dL								
MUN	11.7	11.9	15.5	15.7	1.06	0.01	0.58	0.98	
PUN ³	13.4	13.1	17.3	16.8	1.04	0.01	0.22	0.75	
	g/d								
N Intake	603	631	678	681	19.2	0.01	0.17	0.28	
N Milk	179	178	183	187	21.5	0.01	0.42	0.37	
N Feces	175	173	181	175	10.6	0.83	0.53	0.64	
N Urine	144	137	196	177	9.6	0.01	0.16	0.50	
	% of intake								
N Milk	29.9	28.7	27.1	27.5	0.77	0.01	0.32	0.16	
N Feces	29.2	27.7	26.8	25.1	1.54	0.08	0.26	0.94	
N Urine	24.1	22.7	29.4	26.4	1.58	0.01	0.14	0.58	

675 ¹ PT = protein, MT = methionine, PT×MT = interaction between PT and MT.

676 ² Standard error of the means

677 ³ P-value: Time = < 0.01; PT×Time = 0.31; MT×Time = 0.89; PT×MT×Time = 0.09

678 **Table 7.** Plasma amino acids ($\mu\text{mol/L}$) with low (LCP) and high (HCP) protein, with (RPM) or
 679 without (CTL) rumen protected methionine

	LCP		HCP		SEM ²	P-value ¹		
	CTL	RPM	CTL	RPM		PT	MT	PT×MT
Essential amino acids (EAA)								
Arginine	120	129	120	134	7.0	0.74	0.08	0.66
Histidine	63 ^{ab}	60 ^{ab}	53 ^b	64 ^a	4.5	0.49	0.29	0.08
Isoleucine (Ile)	168	175	167	195	11.3	0.40	0.13	0.33
Leucine (Leu)	137 ^{ab}	132 ^{ab}	124 ^b	147 ^a	9.9	0.89	0.28	0.10
Lysine	100	107	96	115	7.9	0.80	0.08	0.38
Methionine	16	34	16	40	2.5	0.13	0.01	0.19
Phenylalanine	54	55	52	56	2.8	0.90	0.28	0.55
Threonine	61	58	57	68	5.8	0.52	0.46	0.20
Tryptophan	58	57	53	63	4.5	0.85	0.27	0.19
Valine (Val)	187	188	179	209	11.9	0.56	0.17	0.21
Total EAA	936	995	914	1092	58.3	0.67	0.07	0.20
Ile+Leu+Val	492 ^{ab}	470 ^{ab}	444 ^b	552 ^a	30.9	0.59	0.17	0.04
Lys/Met	6.61	3.16	6.28	2.94	0.305	0.24	0.01	0.80
Non-essential amino acids (NEAA)								
Alanine	304	305	278	323	20.9	0.83	0.24	0.25
Aspartate	14	13	14	15	1.4	0.31	0.52	0.32
Glutamate	56	59	54	63	3.8	0.87	0.13	0.46
Glutamine	218	200	203	229	14.8	0.64	0.76	0.22
Glycine	228	252	202	208	29.9	0.23	0.62	0.76
Proline	72	71	67	76	4.9	0.96	0.33	0.29
Serine	94	91	87	97	7.2	0.92	0.56	0.29
Tyrosine	77	79	76	84	4.3	0.65	0.25	0.45
Total NEAA	1047	1071	979	1095	74.7	0.76	0.33	0.52

680 ¹ PT = protein, MT = methionine, PT×MT = interaction between PT and MT. Means overwritten by
 681 different letters on a line differ by pair-wise T-test at $P \leq 0.05$

682 ² Standard error of the means