

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**EFEITOS DA FONTE DE PROTEÍNA E  
SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA SOBRE O DESEMPENHO  
DE BOVINOS EM TERMINAÇÃO ALIMENTADOS COM  
SILAGENS DE RAÇÃO TOTAL MISTURADA**

Autor: Gustavo Lazzari  
Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro – 2020

**EFEITOS DA FONTE DE PROTEÍNA E  
SUPLEMENTAÇÃO LIPÍDICA SOBRE O DESEMPENHO  
DE BOVINOS EM TERMINAÇÃO ALIMENTADOS COM  
SILAGENS DE RAÇÃO TOTAL MISTURADA**

Autor: Gustavo Lazzari

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Fevereiro – 2020

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
(CIP) (Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR,  
Brasil)**

L432e Lazzari, Gustavo  
Efeitos da fonte de proteína e suplementação lipídica sobre o desempenho de bovinos em terminação alimentados com silagens de ração total misturada / Gustavo Lazzari. -- Maringá, 2020.  
xi, 98 f. : il., tabs.

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal, 2020.

1. Bovinos de corte. 2. Silagens de ração total misturada. 3. Novilhas nelore. 4. Desempenho animal. 5. Farelo de soja. I. Daniel, João Luiz Pratti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal. III. Título.

CDD 23.ed. 632.6



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

EFEITOS DA FONTE DE PROTEÍNA E SUPLEMENTAÇÃO  
LIPÍDICA SOBRE O DESEMPENHO DE BOVINOS  
EM TERMINAÇÃO ALIMENTADOS COM SILAGENS  
DE RAÇÃO TOTAL MISTURADA

Autor: Gustavo Lazzari

Orientador: Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADO em 28 de fevereiro de 2020.

Prof. Dr. Flávio Augusto Portela  
Santos

Prof. Dr. Patrick Schmidt

Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel  
Orientador

*“A satisfação está no esforço e não apenas na realização final”*

*Mahatma Gandhi*

*A Deus, a minha família e aos amigos verdadeiros*

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela oportunidade de a cada dia ser uma pessoa melhor;

À Universidade Estadual de Maringá, pela estrutura disponibilizada para o desenvolvimento da pesquisa;

Agradeço ao professor Dr. João Luiz Pratti Daniel pela confiança e apoio durante o desenvolvimento do trabalho e pela amizade que criamos;

Aos meus pais Silvio Luiz Lazzari e Sirlei Eunice Pandolfo Lazzari por todo o amor, carinho, educação e apoio que sempre me deram, sendo essenciais na construção da minha personalidade;

Pela minha namorada Amanda Camila de Oliveira Poppi, por todo seu amor, paciência, e ajuda principalmente nos momentos mais difíceis e por sempre dar seu total apoio em todos os aspectos da minha vida.

Aos meus irmãos Dener Lazzari e Anderson Lazzari por toda a amizade e companheirismo durante toda a vida;

A família Oliveira, em especial a Nilceia de Oliveira por ser minha segunda mãe;

Ao professor Dr. Clóves Cabreia Jobim e aos amigos do grupo GESF, pela amizade e auxílio durante o decorrer do mestrado;

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), em especial ao Wilson Marsola e José Carlos da Silva, por toda a ajuda na realização deste trabalho a nível de campo;

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal (LANA), Angélica e Osvaldo, por me ensinarem a utilizar os equipamentos de laboratório e pelo apoio na condução das análises químicas;

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

## **BIOGRAFIA**

GUSTAVO LAZZARI, filho de Silvio Luiz Lazzari e Sirlei Eunice Pandolfo Lazzari, nasceu em Palotina, Paraná, no dia 6 de janeiro de 1991.

Em fevereiro de 2008, ingressou na Universidade Estadual de Maringá (UEM) e, em janeiro de 2015, obteve o título de bacharel em Zootecnia.

Em março de 2018, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá (UEM), em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes e Conservação de Forragens.

Em fevereiro de 2020, submeteu-se à banca de defesa da Dissertação, requerimento para obtenção do título de Mestre em Produção Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.



# ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| RESUMO.....   | viii   |
| ABSTRACT.....   | x      |
| I. INTRODUÇÃO.....  | 12     |
| 1 REVISÃO DE LITERATURA.....  | 14     |
| 1.1. Alteração em nutrientes não proteicos durante a ensilagem de RTM.....  | 14     |
| 1.1.1. <i>Carboidratos</i> .....  | 14     |
| 1.1.2. <i>Lipídios</i> .....  | 16     |
| 1.1.3. <i>Minerais e Vitaminas</i> .....  | 18     |
| 1.1.4. <i>Aditivos Alimentares</i> .....  | 20     |
| 1.2. Alterações na fração proteica durante a ensilagem de RTM .....   | 21     |
| 1.3. Degradação ruminal da proteína .....   | 24     |
| 1.4. Exigências de proteína para bovinos de corte em terminação.....  | 29     |
| 1.5. Nitrogênio não proteico e proteína verdadeira para bovinos de corte em terminação.....   | 32     |
| 1.6. Suplementação lipídica para bovinos de corte de terminação.....  | 34     |
| 1.7. Valor alimentício de RTM ensilada para ruminantes.....   | 35     |
| 2 REFERÊNCIAS.....  | 39     |
| II. Effects of protein source and lipid supplementation on the finishing beef cattle performance fed with total mixed ration silages..... | 50     |
| ABSTRACT.....   | 51     |
| INTRODUCTION.....   | 53     |
| MATERIAL AND METHODS.....   | 54     |
| Experiment 1.....   | 54     |
| <i>Preparing and Ensiling the TMR</i> .....   | 54     |
| <i>Aerobic Stability test</i> .....   | 55     |
| <i>Laboratorial Analysis</i> .....  | 55     |
| Experiment 2.....   | 58     |
| <i>Preparing and Ensiling the TMR</i> .....   | 58     |
| <i>Animals, Facilities and Collections</i> .....  | 59     |
| <i>Carcass Traits and Slaughter</i> .....   | 61     |
| <i>Chemical Analysis</i> .....  | 61     |
| <i>Protein Degradability</i> .....  | 62     |
| <i>Statistical Analysis</i> .....   | 63     |
| RESULTS.....  | 64     |
| Experiment 1.....   | 64     |
| Experiment 2.....   | 65     |
| DISCUSSION.....   | 67     |
| Experiment 1.....   | 67     |
| Experiment 2.....   | 71     |
| CONCLUSION.....   | 76     |
| REFERENCES.....   | 77     |
| 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....   | 97     |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Table 1.</b> Composition of total mixed rations .....  | 90 |
| <b>Table 2.</b> Characteristics of the fresh and ensiled total mixed rations.....   | 91 |
| <b>Table 3.</b> Fatty acid profile and monensin concentration in fresh and ensiled total mixed rations.....   | 92 |
| <b>Table 4.</b> Chemical composition of offered total mixed ration silages (mean $\pm$ SD).....   | 93 |
| <b>Table 5.</b> Performance and carcass traits of feedlot Nellore heifers fed total mixed ration silages and calculations of net energy and TDN of total mixed ration silages.... | 94 |
| <b>Table 6.</b> Feeding behavior, fecal characteristics and blood parameters of feedlot Nellore heifers fed total mixed ration silages.....                                       | 95 |
| <b>Table 7.</b> Calculations of protein supply in Nellore heifers fed total mixed ration silages.....   | 96 |

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi examinar o processo de conservação e o valor alimentício de silagens de ração total misturada (RTM) para bovinos de corte em terminação. Para alcançar os objetivos, dois experimentos foram conduzidos. O objetivo do Exp. 1 foi avaliar as características fermentativas e a estabilidade aeróbia de silagens de RTM formuladas com diferentes fontes de proteína e estocadas por 120 d. Os tratamentos foram: U (RTM ensilada com ureia); FSnf (RTM ensilada sem uma fonte suplementar de proteína); FS (RTM ensilada com farelo de soja) e GS (RTM ensilada com grão de soja laminado). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado e as médias dos tratamentos foram comparadas por contrastes ortogonais: U vs. FSnf, FSnf vs. FS e FS vs. GS. O tratamento FSnf apresentou menores concentrações de PB solúvel e N-NH<sub>3</sub>, pH e contagem de clostrídios comparado ao tratamento U ( $P \leq 0.03$ ). A concentração de ácido láctico tendeu a ser menor para o FSnf quando comparado ao U ( $P = 0.09$ ). A concentração de etanol foi menor para o tratamento GS quando comparado ao FS ( $P < 0.01$ ) e a concentração de 1,2-propanodiol foi maior para o FSnf comparado ao U ( $P < 0.01$ ), menor para o FS comparado ao FSnf ( $P = 0.02$ ) e maior para o GS comparado ao FS ( $P = 0.02$ ). As perdas de MS durante a fermentação foram baixas (~3,7%) e similares entre os tratamentos. Todas as silagens permaneceram estáveis durante o período de exposição aeróbia (10 d). O objetivo do Exp. 2 foi avaliar os efeitos da fonte de proteína e da suplementação com lipídios sobre o desempenho de novilhas de corte em terminação. Quatro dietas experimentais foram preparadas. As dietas foram as mesmas utilizadas no Exp. 1, mas no tratamento FSnf o farelo de soja foi adicionado no momento da alimentação (farelo de soja não fermentado). Trinta e duas novilhas Nelore ( $313 \pm 8.8$  kg) foram blocadas pelo peso vivo inicial e confinadas em baias individuais por 82 dias (21 dias para adaptação às instalações e às dietas ricas em grãos + 61 dias de comparação das dietas). A variação no CMS tendeu a ser menor para o FSnf quando comparado ao tratamento U ( $P = 0.08$ ) e a espessura de gordura da picanha tendeu a ser maior para o FSnf quando comparado ao U ( $P = 0.09$ ). O CMS, GMD, peso vivo final, peso de carcaça quente, espessura de gordura da picanha e o número de refeições por dia foram maiores para o GS comparado ao FS ( $P \leq 0.05$ ). O pH fecal tendeu a ser menor para o GS quando comparado ao FS ( $P = 0.08$ ). O nível sérico de proteínas totais foi superior para o

tratamento FSnf do que para o U e FS ( $P \leq 0.03$ ). Os níveis séricos de triglicérides e colesterol foram maiores para o GS do que para o FS ( $P \leq 0.05$ ). Em suma, as silagens de RTM apresentaram padrão de fermentação adequado e alta estabilidade aeróbia. A inclusão de fonte de proteína verdadeira não alterou o desempenho animal quando toda dieta foi ensilada, enquanto a adição de fonte de lipídios em dieta com alta proporção de grão de milho ensilado melhorou o desempenho de novilhas Nelore em terminação.

**Palavras-chave:** desempenho, farelo de soja, nelore, novilhas, proteína verdadeira

## ABSTRACT

The objective of this study was to examine the conservation process and feeding value of total mixed ration (TMR) silages. Two experiments were conducted. The objective of the Exp. 1 was to evaluate the fermentation pattern and aerobic stability of TMR silages containing different protein sources and stored by 120 d. The treatments were: ensiled TMR with urea (U); ensiled TMR with no protein supplement (SMnf); ensiled TMR with soybean meal (SM) and ensiled TMR with rolled soybean grain (SG). The experiment was carried out in a completely randomized design and the means of treatments were compared by orthogonal contrasts: U vs. SMnf, SMnf vs. SM and SM vs. SG. The treatment without a protein supplement (SMnf) had lower soluble CP and NH<sub>3</sub>-N, pH and clostridia count compared with U ( $P \leq 0.03$ ). Lactic acid concentration tended to be lower for SMnf when compared to U ( $P = 0.09$ ). The ethanol concentration was lower in SG than in SM ( $P < 0.01$ ) and 1,2-propanediol concentration was higher in SMnf than in U ( $P < 0.01$ ), lower in SM than in SMnf ( $P = 0.02$ ) and higher in SG than in SM ( $P = 0.02$ ). The DM loss during fermentation was low (~3.7%) and similar among treatments. All silages remained stable during 10 d of aerobic exposure after silo opening. The objective of Exp. 2 was to evaluate the effects of protein sources and lipid supplementation on the finishing beef heifers' performance. Diets were the same used in Exp. 1, but in the SMnf treatment soybean meal was added at feeding to balance diet CP. Thirty and two Nellore heifers ( $313 \pm 8.8$  kg SBW) were blocked by initial SBW and housed in individual pens for 82 days (21 days for adaptation and 61 days for diet comparison). The daily DMI variation tended to be higher for U when compared to SMnf ( $P = 0.08$ ) and the *Biceps femoris* fat thickness tended to be lower for U than SMnf treatment ( $P = 0.09$ ). The DMI, ADG, final BW, HCW, *Biceps femoris* fat thickness and number of meals per day were higher for SG compared to SM ( $P \leq 0.05$ ). Fecal pH tended to be lower for SG when compared to SM ( $P = 0.08$ ). Serum total protein concentration was higher for SMnf than U and SM ( $P \leq 0.03$ ). Triglycerides and cholesterol serum levels were higher for SG than

SM treatment ( $P \leq 0.05$ ). In brief, the TMR silages showed adequate fermentation pattern and high aerobic stability. The inclusion of true protein source did not improve the animal performance when the whole TMR was ensiled, meanwhile, the soybean grain addition as a lipid source improved the finishing Nellore heifers' performance.

**Key words:** heifers, Nellore, performance, soybean meal, true protein

## I. INTRODUÇÃO

As rações completas ou rações totais misturadas (RTM) são produzidas pela mistura de forragens, subprodutos, concentrados, minerais, vitaminas e aditivos. Desta mistura de ingredientes os animais poderão consumir os nutrientes necessários para atender suas exigências de manutenção e de produção (Schingoethe, 2017). Quando a dieta é fornecida na forma de RTM, sem seleção de ingredientes, uma maior fermentação ruminal e um melhor uso dos nutrientes deve ocorrer do que quando os ingredientes são fornecidos separadamente (NRC, 2001). Alternativamente à preparação diária da ração, a RTM pode ser ensilada.

Vários trabalhos mostram que RTM ensiladas podem ser bem preservadas, com perdas mínimas de matéria seca (MS) (Weinberg et al., 2011; Chen et al., 2015; Hao et al., 2015; Kondo et al., 2016; Ning et al., 2017), além disso, diversos benefícios são associados a silagem de RTM, como a redução de mão-de-obra e de maquinário especializado na propriedade rural (se a silagem de RTM for comprada), uniformidade na composição da dieta, a possibilidade de conservação de subprodutos úmidos com maior eficiência, menor intensidade de seleção de partículas no cocho devido à redistribuição de umidade (durante a estocagem) e a homogeneidade de mistura dos ingredientes, e alta estabilidade aeróbia (Nishino et al., 2003; Weinberg et al., 2011; DeVries e Gill, 2012; Restelatto et al., 2019).

Quando o produtor opta pela produção da silagem de RTM o alto desembolso de uma só vez na compra dos ingredientes pode ser um desafio. Contudo, o preparo e a ensilagem da RTM podem ser planejados de modo que isto ocorra de modo fracionado ao longo do tempo, não havendo a necessidade de se preparar toda a silagem de RTM de uma só vez. Este planejamento permite ainda a compra dos ingredientes em épocas estratégicas, com preços mais favoráveis. A necessidade de altos investimentos para a produção da silagem de RTM, principalmente de maquinário, pode ser outro desafio ou desvantagem, contudo a terceirização de sua produção ou até mesmo a compra da RTM de indústrias especializadas em sua produção, podem ser alternativas para aqueles produtores que não desejam imobilizar recursos em máquinas.

Do ponto de vista nutricional, um ponto a se destacar é o aumento da digestibilidade do amido com a ensilagem de grãos de cereais, devido à quebra da matriz proteica que circunda os grânulos de amido no endosperma (Hoffman et al., 2011) feita principalmente

pelas bactérias proteolíticas durante o período de estocagem (Junges et al., 2017). Como consequência, a ensilagem de TMR contendo grãos de cereais melhora a eficiência alimentar e o desempenho dos animais (Owen e Howard, 1965; Miyaji e Nonaka 2018). Contudo durante a estocagem a maior parte da proteína verdadeira é hidrolisada, sendo convertida à proteína solúvel, que em parte é degradada à amônia (Benton et al., 2005) o que possivelmente reduz o fluxo intestinal de proteína metabolizável.

Estas alterações dos nutrientes ocasionadas pela ensilagem podem levar a mudanças no valor nutritivo de dietas ofertadas aos ruminantes. Sendo assim, os objetivos do primeiro experimento deste estudo foram investigar as características da fermentação e a estabilidade aeróbia de silagens de RTM. Em um segundo experimento os objetivos foram averiguar se bovinos de corte em terminação respondem à suplementação com fonte de proteína verdadeira (farelo de soja), quando o principal ingrediente da dieta é o grão de milho laminado submetido à fermentação na forma de silagem de RTM, verificar se a inclusão da fonte de proteína verdadeira (farelo de soja) pode ser feita na ensilagem da ração total ou deve ser suplementada no momento da alimentação e ainda, averiguar se os animais respondem à ensilagem de grão de soja laminado, como fonte energética e proteica.



## **1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1. Alterações em nutrientes não proteicos durante a ensilagem de RTM**

#### **1.1.1. Carboidratos**

No processo fermentativo de silagens os principais substratos utilizados para o crescimento microbiano são os carboidratos solúveis presentes no conteúdo celular (principalmente sacarose, glicose e frutose). Após a ensilagem estes substratos são convertidos à diferentes produtos de fermentação dependendo do tipo de microrganismo atuante (Rooke e Hatfield, 2003) e devido ao consumo dos carboidratos solúveis feito pelos microrganismos uma redução em seus teores é esperada.

Em diversos estudos com RTM ensilada foram encontradas diminuições significativas no teor de carboidratos solúveis durante o processo de fermentação (Weinberg et al., 2011; Wang et al., 2016; Ning et al., 2017). Kondo et al. (2016) encontraram menores concentrações de carboidratos solúveis para RTM ensilada quando comparada com RTM fresca (0,7% versus 5,3% da MS, respectivamente), independentemente do tempo (30 ou 90 dias) e da temperatura (15°C ou 30°C) de estocagem. As alterações no conteúdo final de carboidratos solúveis nas silagens de RTM dependem do teor inicial de carboidratos solúveis e do curso da fermentação, porém, grande parte dos carboidratos solúveis é consumida nas primeiras semanas de fermentação (Wang et al., 2016; Ning et al., 2017).

Assim como nas silagens convencionais adequadamente conservadas as bactérias lácticas predominam na fermentação de silagens de RTM e o ácido lático é o principal produto final, porém, outros compostos são formados (e.g. aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos graxos voláteis). Os produtos finais da fermentação são os responsáveis pela preservação da massa ensilada durante o armazenamento e após a abertura do silo. Além disso, quando consumidos pelos animais, estes compostos têm importância nutricional significativa (Daniel et al., 2013). O perfil dos produtos finais de fermentação dependerá de alguns fatores, como, os ingredientes da ração, o teor de MS, o tempo e a temperatura de estocagem, o uso de aditivos, entre outros (Miyaji et al., 2012; Wang e Nishino, 2013; Chen et al., 2014; Hao et al., 2015). Por exemplo, nas silagens de RTM a inclusão de ureia, premix mineral, calcário e tampões, como o bicarbonato de sódio, aumentam a capacidade tampão e estimulam a formação de ácido lático, como já demonstrado em estudos anteriores com silagens de milho e cana-de-açúcar (Klosterman et al., 1961;

Byers et al. 1964; Custódio et al., 2016). A ingestão de ácido lático tem sido associada a maior proporção de ácido propiônico, aumento de pH do fluido ruminal (*in vivo*) (Jaakkola e Huhtanen, 1989; Daniel et al., 2013) e diminuição da produção de metano (*in vitro*) (Wagner et al., 2018).

Diferentemente dos carboidratos solúveis, o amido e os polissacarídeos constituintes da parede celular vegetal, principalmente celulose, hemicelulose e pectina, são utilizados em menores proporções como substrato para os microrganismos durante o processo de fermentação (Rooke e Hatfield, 2003).

Decréscimos no teor de amido devido a ensilagem geralmente não são esperados, em virtude da baixa atividade amilolítica das bactérias responsáveis pela fermentação (Rooke e Hatfield, 2003; Der Bedrosian et al., 2012; Ferraretto et al., 2015). Contudo, Ning et al. 2017 ao trabalharem com RTM ensilada contendo feno de alfafa ou feno de *Leymus chinensis* relataram perdas significativas na massa de amido até o final do período (56 d) de estocagem. Resultados semelhantes foram encontrados por Miyaji et al. (2017) em silagens de RTM contendo milho floculado ou arroz integral, armazenadas por 210 d, com perda média de 22,8% do amido. Apesar disso, devido ao consumo de outros nutrientes durante a fermentação, a concentração de amido em RTM ensilada tende a ser similar à de RTM fresca.

Por outro lado, a ensilagem geralmente promove aumento da digestibilidade do amido, especialmente do amido contido em grãos de cereais com maior teor de prolaminas em seu endosperma, como por exemplo, o milho flint e o sorgo (Benton et al., 2005; Hoffman et al., 2011). As prolaminas são proteínas hidrofóbicas que envolvem os grânulos de amido formando uma matriz proteica e dificultando assim a digestão do amido. Durante a ensilagem a atividade das proteases diminui a concentração das prolaminas e aumenta a disponibilidade de amido (Hoffman et al., 2011; Der Bedrosian et al., 2012; Junges et al., 2017).

Miyaji et al. (2017) reportaram aumento na degradabilidade ruminal de amido em silagens de RTM quando comparadas com RTM frescas, sendo 6,83% e 1,57% de aumento para as silagens de RTM contendo milho floculado e arroz integral, respectivamente. Miyaji e Nonaka (2018) relataram aumento na digestibilidade de amido no trato total de vacas de leite que receberam silagens de RTM contendo arroz laminado ou floculado em comparação aos animais que receberam RTM frescas, o valor médio para as dietas ensiladas foi de 97,2% e para as dietas não ensiladas foi de 91,6%, o que elevou o desempenho produtivo dos animais.

Assim como acontece com o amido, o conteúdo de polissacarídeos constituintes da parede celular vegetal geralmente pouco se altera com a ensilagem e a quebra destes polímeros da parede celular parece mais provável em silagens com maior teor de umidade. Jones et al. (1992) encontraram menores teores de alguns carboidratos da parede celular (ácidos urônicos, ramnose, arabinose e galactose) em silagem de alfafa com baixo teor de MS (29% de MS), do que no mesmo material ensilado com maior teor de MS (40% de MS). Weinberg et al. (2011) reportaram perdas de FDN (recuperação de 88%) e menor teor de FDN (38% versus 34%) em RTM ensilada por 140 d comparada à RTM fresca, ambas com 50% de MS. Já em uma RTM ensilada com teor mais alto de MS (64,8% de MS) os mesmos autores não encontraram perdas de FDN ou alterações na concentração de FDN (38% na média).

As perdas destes carboidratos de mais difícil degradação podem ocorrer também pela ação da hidrólise ácida que acontece no processo fermentativo da silagem (Dewar et al., 1963). Ning et al. (2017) analisaram a ocorrência de perdas de carboidratos e atividade de hemicelulases em RTM ensiladas. A atividade destas enzimas não foi observada pelos autores após 14 d de estocagem, porém as perdas de hemicelulose aumentaram continuamente em ambas as silagens até 56 d de estocagem (19,9% na RTM de feno de alfafa e 23,5% na RTM de feno de *Leymus chinensi*), provavelmente devido a hidrólise ácida.

Wang et al. (2016) observaram alterações na concentração de FDN em RTM ensilada, formulada com silagem de milho. Quando comparada à RTM fresca, o teor de FDN foi menor (43% versus 46%), já o teor de FDA se manteve constante durante a estocagem (27% na média). Por outro lado, Kondo et al. (2016) não encontraram mudanças no teor de FDN após ensilar uma RTM, independentemente do período (30 ou 90 d) e da temperatura (15°C ou 30°C) de armazenamento.

### **1.1.2. Lipídios**

As fontes primárias de lipídios nas dietas de ruminantes são as forragens e os concentrados. Tipicamente as forragens possuem na massa seca do tecido foliar de 6 a 8% de lipídios, sendo os glicolipídios e os fosfolipídios as classes mais representativas, enquanto nos alimentos concentrados os principais componentes são os triglicerídeos (Harfoot, 1981).

Este vasto grupo de moléculas exerce diferentes funções biológicas, os ácidos graxos por exemplo funcionam como reserva energética, enquanto os galactolipídios e

fosfolipídios são os principais componentes das membranas biológicas em forragens (Nelson e Cox, 2015). Em geral, o principal ácido graxo em forragens é o ácido linolênico (C18:3 n-3), enquanto os cereais e as oleaginosas são ricas em ácido linoleico (C18:2 n-6). Os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0) e oleico (C18:1) também estão presentes em concentrações significativas em forragens e concentrados (Palmquist e Mattos, 2011; Liu et al., 2018; Liu et al., 2019).

O conteúdo total de lipídios em silagens bem conservadas é semelhante ao do material fresco (Alves et al., 2011, Liu et al., 2019), pois estes não são combustíveis usuais para a fermentação (Mackie et al., 1991). A falta de oxigênio em silos adequadamente vedados gera um excesso de equivalentes redutores (e.g. NADH) e isso restringe o uso de moléculas reduzidas para produção de energia, como os ácidos graxos (Nelson e Cox, 2015). No entanto mudanças no conteúdo de alguns ácidos graxos já foram observadas em silagens (Liu et al., 2018; Liu et al., 2019).

Elgersma et al., (2003) compararam a proporção de ácidos graxos livres (não esterificados) em azevém. Na forragem fresca, apenas 2% dos ácidos graxos estavam em sua forma livre, mas após a ensilagem esse nível subiu para 50%. Lipases e lipoxigenases estão associadas a atividade lipolítica durante a ensilagem. As lipases (hidrolases de éster carboxílico) estão presentes em forragens frescas e grãos (Barros et al., 2010; Liu et al., 2018; Liu et al., 2019) e podem clivar as ligações éster dos triglicerídeos, liberando glicerol e ácidos graxos livres (Gadge et al., 2011). As lipoxigenases podem oxidar os ácidos graxos livres, principalmente os ácidos linoleico e linolênico, produzindo inicialmente peróxidos que são posteriormente clivados em aldeídos e cetonas (Feussner e Wasternack, 2002; Senger et al., 2005). No entanto, a ação destas enzimas é maior logo após a colheita e em silagens mal conservadas, além de sofrer influência de pH e temperatura. As condições ideais para a atividade das lipases estão próximas a 24°C e pH 8 e para as lipoxigenases, a atividade ideal ocorre em condições de pH entre 6,5 a 8 (Malekian et al., 2000; Gadge et al., 2011), indicando que uma rápida acidificação da silagem pode impedir a clivagem dos ácidos graxos.

Além das enzimas das plantas, a lipólise pode ocorrer pela ação de algumas cepas de bactérias lácticas encontradas em silagens. Estes microrganismos por meio da atividade de biohidrogenação reduzem o conteúdo de ácidos graxos insaturados (Liu et al., 2019). Ding et al. (2013) ao avaliarem a contribuição de enzimas da planta e da atividade dos microrganismos sobre a lipólise em alfafa ensilada, relataram diminuição de ácidos graxos insaturados (C18:2 n-6 e C18:3 n-3) nas silagens controle (43%) ou esterilizada

(28%), enquanto na silagem auto clavada (para inibir enzimas da planta e atividade microbiana) o perfil de ácidos graxos foi similar ao da forragem fresca; contudo a silagem controle apresentou nível maior do ácido graxo C16:0 em comparação à forragem fresca. Liu et al. (2019) também reportaram maior proporção do C16:0 em silagem de aveia quando comparada a forragem fresca. Han e Zhou (2013) observaram em silagem de milho alterações dos principais ácidos graxos (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 e C18:3) durante os 2 primeiros dias após a ensilagem. Eles atribuíram o aumento na proporção dos ácidos graxos saturados à diminuição dos ácidos graxos insaturados e estas alterações à atividade da lipoxigenase, que foi beneficiada pelo maior pH nas primeiras horas após a ensilagem.

Wongnen et al. (2009) em estudo com RTM ensilada, com inclusão de caroço de algodão inteiro ou laminado, também reportaram aumento na proporção do ácido graxo C16:0 em relação à RTM fresca. No geral, não é esperado grande alteração na concentração de ácidos graxos totais em silagens adequadamente fermentadas, uma vez que estes compostos não são combustíveis comuns para a fermentação. Porém, espera-se aumento na concentração de ácidos graxos livres e alterações nas proporções de ácidos graxos específicos, como diminuição dos ácidos graxos insaturados e aumento na proporção de ácidos graxos saturados.

### **1.1.3. Minerais e vitaminas**

Os menores requerimentos de minerais e vitaminas em relação aos demais nutrientes não os tornam menos importantes nas dietas para ruminantes. Os minerais são importantes para a manutenção de diversos processos vitais do organismo e, conseqüentemente, para a produtividade animal, assim como as vitaminas que são moléculas complexas essenciais para diversas vias metabólicas, para o sistema imunológico e expressão gênica (NRC, 2001).

As vitaminas são classificadas em lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (B e C) (McDowell, 2000). Aquelas do complexo B e K são sintetizadas por microrganismos do rúmen, a vitamina D é produzida a partir de esteroides presentes na pele, após exposição à luz solar, e glicose e galactose são convertidas em vitamina C quando necessário (NRC, 2001). Assim, as vitaminas A e E são as mais requeridas de fontes exógenas. Os carotenos (provitamina A) e tocoferóis (vitamina E) presentes nas forragens frescas são as principais fontes destas vitaminas, embora os grãos também possam contribuir (Kalač, 2012; Nozière et al., 2006; Lindqvist et al., 2011; Liu et al., 2016).

No caso dos minerais, a concentração destes compostos em forragens adequadamente conservadas é levemente superior ao da forragem fresca (Meschy et al., 2005; Baumont et al., 2011). Contudo, o conteúdo de minerais específicos pode ser alterado durante a ensilagem. Schlegel et al. (2018) observaram aumentos nas concentrações de Mn (+65%), Na (+33%), Se (+27%), Zn (+13%) e Mg (+12%) em silagens de gramíneas e leguminosas quando comparadas à suas respectivas forragens frescas. Por outro lado, não foram observadas alterações nos teores de Ca, P, K, Cl, S e Cu. No geral as concentrações de macro e micro minerais aumentaram em média 6% e 31%, respectivamente, sendo explicadas pelas perdas de nutrientes fermentáveis.

O desenvolvimento microbiano e condições de baixo pH têm sido relacionados à maior disponibilidade de minerais em silagens. Lee et al. (2019) relataram que algumas espécies de bactérias lácticas possuem capacidade de aumentar a biodisponibilidade de selênio inorgânico durante a fermentação da silagem, convertendo o selenito de sódio em selênio orgânico. Hansen e Spears (2009) observaram que a ensilagem aumentou a disponibilidade de Fe na silagem de planta inteira de milho, provavelmente devido às condições ácidas da silagem. Rooke et al. (1983) reportaram alta disponibilidade de minerais (Ca, Na, P, K, Mg e Cu) em silagens de capim.

Diferentemente dos macro e micro minerais, perdas de carotenoides e tocoferóis têm sido associadas à conservação de forragens, porém, menos relacionadas à ensilagem e muito mais à fenação (Carter, 1960). Estes compostos são propensos à oxidação após a colheita. A exposição à radiação ultravioleta, oxigênio, altas temperaturas e a atividade de lipoxigenases são as principais causas de destruição do caroteno (Kalač and McDonald, 1981; Cardinault et al., 2004; Nozière et al., 2006; Kalač, 2012). Os tocoferóis são antioxidantes naturais e por terem essa função de proteger outras moléculas da oxidação podem também acabar sendo degradados (McDowell, 2000).

Kalač e Kyzlink (1979) relataram que os carotenoides são rapidamente degradados quando expostos ao oxigênio em condições de baixo pH (3,7 a 4,2). No mesmo estudo, a degradação de carotenoides foi maior na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Por outro lado, uma rápida síntese de ácido láctico na ausência de oxigênio apresentou correlação positiva com as concentrações de  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol, indicando que uma rápida queda de pH em condições anóxicas é benéfica para a conservação de (pro) vitaminas, conforme encontrado em silagens bem preservadas (Müller et al., 2007; Lindqvist et al., 2011). Nozière et al. (2006) e Liu et al. (2019) reportaram perdas de carotenos durante a ensilagem em 20% (para silagens em geral) e 25,5% (para silagem de aveia). Segundo

Liu et al. (2019) a perda de caroteno durante a ensilagem foi atribuída a atividade de lipoxigenases. No mesmo trabalho o tocoferol foi menos degradado (11,6%) que o caroteno, sendo atribuído a este fato a maior estabilidade do tocoferol em condições anóxicas, além de uma possível atividade de bactérias produtoras de tocoferol (Tani e Tsumura, 1989).

Estrutura dos silos, tempo e temperatura de armazenamento e uso de aditivos também afetam a perda de vitaminas durante a ensilagem. Nadeau et al. (2004) observaram diminuição de vitaminas em silagens (gramíneas e leguminosas) armazenadas em silos-fardo. O  $\alpha$ -tocopherol e o  $\beta$ -caroteno diminuíram 49% (de 35 para 18 mg/kg MS) e 37% (de 19 para 12 mg/kg MS), respectivamente, durante três meses de estocagem. Já em silos bunker e em silos torre o teor de vitaminas foi similar ao das forragens frescas. Esses resultados foram atribuídos ao maior risco de infiltração de oxigênio e oxidação de vitaminas em silos-fardo. Jareš (2018) reportou diminuição do nível de tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) em silagens de grão de milho reidratado ao longo do tempo de armazenamento (total de 185 dias). Segundo Lindqvist et al. (2011), silagens de trevo vermelho inoculadas (*Lactobacillus plantarum* e *Pediococcus acidilactici*) apresentaram maiores teores de tocoferol do que a silagem controle não inoculada (50,1 versus 34,2 mg/kg de MS). Em contraste, Liu et al. (2019) observaram redução no conteúdo de carotenos em silagem de aveia inoculada com *Lactobacillus plantarum*. O uso de ácido propiônico (4 kg/t de MN), contudo, foi efetivo no controle de perdas de caroteno, uma vez que nas silagens tratadas a concentração não diferiu da concentração na forragem fresca.

Apesar da falta de informações sobre as alterações sofridas por minerais e vitaminas com a ensilagem de RTM, espera-se pequenas alterações no teor de minerais em RTM ensilada, porém um aumento na disponibilidade dos mesmos. Quanto às vitaminas, as silagens de RTM geralmente contêm fontes exógenas de vitaminas, que em termos de estabilidade, podem diferir das fontes naturais encontradas nos alimentos, e, então, devido a isso e a escassez de informações, as perdas de vitaminas neste tipo de dieta são incertas.

#### **1.1.4. Aditivos alimentares**

Poucos estudos avaliaram os efeitos dos aditivos alimentares sobre a conservação de forragens, porém, não há informações sobre as alterações que os aditivos alimentares possam sofrer durante a ensilagem e suas consequentes ações na alimentação dos animais. Hoon e Meeske (2011) investigaram o efeito da lasalocida sódica (um antibiótico

ionóforo) na conservação de silagem de milho. Em comparação à silagem não tratada, a lasalocida (0,15 g/kg de MN) diminui a concentração de ácido lático e aumentou as perdas fermentativas, resultando em uma silagem com menor digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica. A silagem tratada também apresentou deterioração aeróbia mais intensa, como indicado pela maior produção de dióxido de carbono durante a exposição ao ar. Vale ressaltar que as bactérias lácticas são gram-positivas e sensíveis a ação de ionóforos.

Kung et al. (2008) examinaram o efeito de uma mistura comercial de óleos essenciais (40 ou 80 mg/kg de MN) na conservação de silagem de milho. A mistura de óleos essenciais não afetou as populações de leveduras, fungos, bactérias lácticas ou enterobactérias, os produtos finais da fermentação ou a estabilidade aeróbia da silagem. Foskolos et al. (2016) investigaram os efeitos de óleos essenciais sobre a degradação de proteínas em silagens de azevém. Cinco compostos (timol, eugenol, cinamaldeído, capsaicina e carvacrol) em quatro doses (de 0 a 2 g/kg de MN) foram pulverizados na forrageira antes da ensilagem. Timol, eugenol e cinamaldeído na dose de 2 g/kg e carvacrol nas doses de 0,5 e 2 g/kg inibiram a deaminação. O cinamaldeído na dose de 2 g/kg resultou em silagens com aproximadamente 10% a mais de proteína verdadeira em relação as demais silagens. Entretanto, a maior dose dos óleos essenciais (2 g/kg) afetou negativamente o processo fermentativo, diminuindo a contagem de bactérias ácido lácticas e a concentração de ácido lático e aumentando o pH das silagens.

Assim como para os demais nutrientes, espera-se que os aditivos alimentares possam sofrer alterações durante o processo fermentativo de silagens. Porém, a capacidade de atuação destes no rúmen e no metabolismo do hospedeiro após serem submetidos a fermentação ainda precisa ser investigada.

## **1.2. Alterações na fração proteica durante a ensilagem de RTM**

Proteínas são macromoléculas compostas primariamente por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, cada um deles possuindo um grupamento amino ( $\text{NH}_3^+$ ) e um grupamento carboxílico (COOH) unidos ao mesmo átomo de carbono. Além dos aminoácidos, as proteínas podem conter outros grupos químicos como o grupo heme (heme proteínas), lipídios (lipoproteínas) e açúcares (glicoproteínas). Essenciais ao metabolismo, as proteínas participam da estruturação dos tecidos (proteínas estruturais), possuem funções enzimáticas e hormonais, atuam na recepção de estímulos hormonais e também no armazenamento de informações genéticas (Nelson e Cox, 2015).



Vinte diferentes aminoácidos estão presentes nas proteínas de microrganismos, plantas e animais, e do ponto de vista da nutrição de ruminantes, dez deles são considerados “essenciais” ou “indispensáveis”. Neste grupo se encontram a arginina (Arg), histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis) metionina (Met), fenilalanina (Phe), treonina (Thr), triptofano (Trp) e valina (Val). Os aminoácidos essenciais são assim denominados por não serem sintetizados pelo organismo do animal, ou então se forem (Arg e His), são em quantidades insuficientes para atender às exigências do metabolismo. Ao contrário, os demais aminoácidos considerados “não essenciais” são sintetizados pelos tecidos em quantidades suficientes para atender às exigências, a partir de metabólitos do metabolismo intermediário e também de grupamentos amino provenientes do excesso de aminoácidos (NRC, 2001).

Conceitualmente a proteína dos alimentos e/ou das dietas para ruminantes é referida como proteína bruta (PB), que é obtida pelo cálculo do teor de nitrogênio (N)  $\times$  6,25. A premissa para esta definição é de que, em média, o N corresponde a 16% do peso da proteína total dos alimentos e /ou dietas. No cálculo da PB estão inclusos tanto o N na forma proteica (proteína verdadeira) quanto o N na forma não proteica (NNP), o qual é representado por aminoácidos livres, peptídeos, ácidos nucleicos, amidas, aminas e amônia (NRC, 2001).

Perdas de N durante o processo fermentativo de silagens podem ocorrer, contudo, são normalmente menos expressivas do que de outras frações solúveis, com efeitos menores no conteúdo de PB (Rooke e Hatfield, 2003). Silagens com teores de PB ligeiramente mais elevados em comparação ao de suas culturas são comuns, por causa do consumo de outros nutrientes, principalmente de carboidratos solúveis. Por outro lado, ocorre extensiva quebra de proteína durante a fermentação. A transformação parcial da proteína verdadeira em compostos não proteicos devido a ensilagem é um processo inevitável, realizado por enzimas vegetais e microbianas (McDonald et al., 1991).

A ocorrência de proteólise em forragens com alto teor de PB (leguminosas, gramíneas temperadas) é indesejável levando à menor eficiência de uso de N (EUN) pelo animal (Huhtanen et al., 2008; Hymes-Fecht et al., 2013). No entanto, em silagens de milho e sorgo (silagens de planta inteira ou de grãos), a proteólise tem sido positivamente associada à digestibilidade do amido, em virtude da degradação das proteínas hidrofóbicas (prolaminas) que circundam os grânulos de amido (Hoffman et al., 2011). Esse aumento de digestibilidade do amido geralmente resulta em maior síntese de

proteína microbiana no rúmen e, por sua vez, em maior EUN (Wilkerson et al., 1997; Valadares et al., 1999; San Emeterio et al., 2000).

Nas RTM convencionais (não ensiladas), fontes de proteína são incorporadas à ração para balancear as perdas de proteína verdadeira que ocorrem durante o armazenamento dos ingredientes ensilados, visando o atendimento das exigências de proteína metabolizável do animal. Contudo, nas silagens de RTM, pelo fato de todos os ingredientes serem ensilados, todas as fontes de proteínas são expostas à proteólise. Durante a ensilagem a degradação da proteína ocorre em duas fases. Primeiramente, as proteínas são hidrolisadas pela ação das proteases vegetais e microbianas, e resulta em peptídeos e aminoácidos livres (Kemble, 1956; Heron et al., 1986; McDonald, 1991; Rooke e Hatfield, 2003). Posteriormente, a descarboxilação dos aminoácidos leva à formação de aminas biogênicas e dióxido de carbono, enquanto a deaminação dos aminoácidos resulta em amônia e ácidos orgânicos (Oshima e McDonald, 1978; Scherer et al., 2015).

Heron et al. (1986) e Kemble (1956) observaram que silagens de azevém e de capim-timóteo esterilizadas antes da ensilagem, apresentaram ainda grande quantidade de aminoácidos livres, indicando uma grande contribuição das enzimas vegetais para a proteólise. Em silagem de alfafa, Ding et al. (2013) relataram que a ensilagem aumentou a proporção de NNP de 26% para 73% do N total, e que as enzimas vegetais contribuíram com aproximadamente 2/3 da proteólise, enquanto os microrganismos contribuíram com 1/3. A maior parte do NNP permaneceu como peptídeos (~70% do NNP), os quais são mais eficientemente usados pelos microrganismos ruminais e pelo animal em comparação ao nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) (Broderick et al., 2013). Junges et al. (2017) reportaram que em silagem de milho reidratado as enzimas bacterianas foram as principais responsáveis pela proteólise durante a fermentação (60%), seguidas pelas proteases das plantas (30%) e por último, por enzimas de fungos e produtos de fermentação que contribuíram com aproximadamente 5% da proteólise. Enterobactérias, clostrídios e bacilos são os principais candidatos envolvidos na quebra de proteínas durante a fermentação de silagens (McDonald et al., 1991; Pahlow et al., 2003).

Não foram encontradas pesquisas que apontem a contribuição de microrganismos e proteases da planta sobre a proteólise em silagens de RTM, porém as fontes de ingredientes destas silagens podem afetar a proteólise. Nishino et al. (2007) reportaram menor síntese de aminas biogênicas (histamina, cadaverina, tiramina e putrescina) em silagens de RTM do que em silagens de planta inteira de milho e de festulolium, talvez

porque os ingredientes usados na formulação da RTM (grãos secos e subprodutos tratados termicamente) fossem menos suscetíveis à proteólise, reduzindo substratos (aminoácidos livres) para a síntese de amins biogênicas.

A extensão da transformação de proteínas durante a ensilagem é determinada por um conjunto de fatores capazes de alterar as atividades enzimáticas e microbianas, como pH, umidade, temperatura e tempo de estocagem. Em geral, a queda rápida de pH abaixo de 4 reduz acentuadamente a quebra de proteínas (Virtanen, 1993; McKersie, 1985; Heron et al., 1986; Heron et al., 1989). No entanto, a degradação de proteínas pode continuar durante o armazenamento prolongado (Hoffman et al., 2011).

Hao et al. (2015) avaliaram o teor de umidade (40%, 45% e 50% de umidade) e o tempo de armazenamento (de 0 a 56 dias) e não relataram diferenças no teor total de N em silagens de RTM. Contudo, o maior teor de umidade proporcionou aumento do conteúdo de NNP (aminoácidos livres e N-NH<sub>3</sub>) durante a fermentação. A proteólise aumentou continuamente durante o período de estocagem, porém, as maiores transformações nas frações de N foram observadas na primeira semana de armazenamento. Segundo os autores, no dia 56 de armazenamento, 43% do N era NNP. Kondo et al. (2016) observaram maiores teores de proteína solúvel (PS) e N-NH<sub>3</sub> em RTM ensiladas com prolongado período de estocagem e com maior temperatura de estocagem. Não foram relatadas diferenças no teor de PS para a RTM ensilada armazenada por 30 dias em comparação à RTM fresca, enquanto na RTM ensilada por 90 dias houve aumento na concentração de PS. Além disso, a silagem armazenada a 30°C apresentou maior teor de PS do que a silagem armazenada a 15°C. O N-NH<sub>3</sub> aumentou com a temperatura e com o período de estocagem.

### **1.3. Degradação ruminal da proteína**

A proteína bruta contida nos alimentos é dividida em duas frações, uma fração degradável no rúmen (PDR) e a outra não degradável no rúmen (PNDR) (NRC, 1985). A degradação da proteína no rúmen se dá pela ação de enzimas (proteases, peptidases e deaminases) secretadas pelos microrganismos ruminais. Ao degradarem a fração PDR da PB dos alimentos, os microrganismos utilizam os peptídeos, aminoácidos e amônia para a síntese de proteína microbiana e crescimento celular (Broderick et al., 1991; Wallace, 1996; Broderick, 1998). Alguns aminoácidos são utilizados para a síntese de ácidos graxos voláteis (AGV), como por exemplo, a prolina, que pode ser convertida à valerato e os aminoácidos de cadeia ramificada valina, leucina e isoleucina, que podem ser

convertidos à AGV de cadeia ramificada (isobutirato, 2-metil-butirato e iso-valerato). Esses AGV de cadeia ramificada representam fatores de crescimento essenciais para certas espécies de bactérias no rúmen (Dehority et al., 1958; Cotta e Hespell, 1986).

Quando a velocidade de degradação ruminal da proteína excede a velocidade de utilização dos compostos nitrogenados pelos microrganismos para a síntese de proteína microbiana, a amônia que é produzida em excesso no rúmen, oriunda da quebra dos peptídeos e aminoácidos, atravessa a parede ruminal e pode ser perdida via urina na forma de ureia. Além disso, parte dos peptídeos e aminoácidos livres não degradados podem não ser incorporados nas células microbianas e acabam passando para o duodeno, onde então serão absorvidos pelo ruminante (NRC, 2001).

As bactérias são os principais microrganismos envolvidos na degradação de proteína no rúmen, por serem os microrganismos mais abundantes (até  $10^{11}$ /ml) e por mais de 40% das espécies apresentarem atividade proteolítica (Broderick et al., 1991; Wallace, 1996; Mackie et al., 1999). A atividade da maioria das proteases bacterianas está associada a superfície da parede celular, porém, pode ocorrer também livre da célula (menos de 10%) (Kopečný e Wallace, 1982; Broderick, 1998). O passo inicial para a degradação da proteína no rúmen se dá com sua adsorção pela bactéria, tanto a fração solúvel quanto a fração não solúvel da proteína podem ser adsorvidas e sofrerem a ação das proteases (Wallace, 1985; Broderick et al., 1991). Após a primeira ação das proteases são originados os oligopeptídeos, que são então degradados pelas oligopeptidases à pequenos peptídeos e aminoácidos livres. Já no ambiente intracelular, após a captação bacteriana destes compostos, os pequenos peptídeos são degradados à aminoácidos livres, por sua vez, estes são incorporados na proteína microbiana ou então deaminados, gerando amônia e esqueletos carbônicos. A amônia oriunda da deaminação pode ser usada para a síntese de aminoácidos e quando não utilizada é difundida para fora da célula (Broderick, 1998).

Apesar de menos numerosos no rúmen ( $10^5$ ,  $10^6$ /ml), os protozoários também participam ativamente na degradação de proteína. Por serem de maior tamanho em relação aos demais microrganismos, eles representam uma significativa porção da massa microbiana ruminal. Diferentemente das bactérias, os protozoários não formam complexos com a proteína, mas ingerem principalmente bactérias, além de fungos e pequenas partículas de alimentos, sendo estes digeridos no interior da célula. As proteínas ingeridas são degradadas à peptídeos e aminoácidos livres, que são então incorporados na proteína dos protozoários. Outra diferença em relação as bactérias, é que mesmo realizando deaminação, os protozoários não sintetizam novos aminoácidos a partir da

amônia. Por último, os protozoários liberam quantidades significativas de peptídeos e aminoácidos, bem como de peptidases no fluido ruminal, devido à processos secretórios, autólise celular e morte (Jouany e Ushida, 1999).

O acesso microbiano às proteínas pode ser afetado por aspectos físicos, como a estrutura tridimensional, e ligações químicas (Mangan, 1972; Nugent e Mangan, 1978). Proteínas que apresentam grande número de ligações químicas, como as pontes de dissulfeto, são menos acessíveis as enzimas proteolíticas e então degradadas mais lentamente (Hurrell e Finot, 1985). O tratamento térmico de grãos ou de seus subprodutos (tostagem, peletização, extrusão, floculação) normalmente reduzem a degradabilidade da proteína (Whitelaw et al., 1961; Tagari et al., 1962; Arieli et al., 1989; Lykos e Varga, 1995), pela formação de complexos entre a proteína e carboidratos (reação de Maillard) e pelo aumento da formação de pontes de dissulfeto (Hurrell e Finot, 1985). Esta técnica tem sido usada com o objetivo de reduzir a degradabilidade ruminal da proteína e as perdas ruminais na forma de amônia, aumentando o suprimento de proteína verdadeira que chega ao intestino (Broderick e Craig, 1980; Tagari et al., 1986).

A composição química da proteína também influencia a extensão da degradação da PB no rúmen. As proporções de proteína verdadeira e de NNP afetam de forma significativa esse parâmetro. O NNP é constituído em grande parte por peptídeos, aminoácidos livres e amônia, mas também por ácidos nucleicos, amidas e aminas (NRC, 2001). Embora historicamente tenha-se assumido degradação ruminal completa da fração NNP (Sniffen et al., 1992), parte dos aminoácidos, peptídeos e proteínas com menor tamanho podem passar para o duodeno sem sofrer degradação no rúmen (NRC, 2001). Como já relatado anteriormente, grande parte da proteína verdadeira é convertida em NNP quando forragens, grãos ou RTM são ensilados, em virtude da proteólise realizada pelas enzimas vegetais e microbianas no silo, por isso a ensilagem tem grande efeito sobre o aumento da degradabilidade ruminal da proteína.

A solubilidade é outra característica que pode influenciar na extensão da degradação da PB no rúmen, embora a solubilidade apresente baixa correlação com a degradabilidade ruminal da proteína quando alimentos de diferentes classes são comparados (Stern e Satter, 1984), pois frações solúveis de diferentes proteínas possuem diferentes taxas de degradação (Annison, 1956; Mangan, 1972; Mahadevan et al., 1980). A correlação entre solubilidade e degradabilidade ruminal da proteína é alta quando o mesmo alimento ou alimentos similares são comparados (Beever et al., 1976; Sniffen et al., 1992). Outros fatores não relacionados com as propriedades químicas ou físicas da proteína, como

tempo de retenção do alimento no rúmen, atividade proteolítica microbiana e pH ruminal, afetam também a degradabilidade ruminal da proteína (NRC, 1985).

A quantificação da degradabilidade ruminal da proteína pode ser realizada por meio de diferentes métodos. Esses métodos incluem avaliações *in vivo*, *in situ* e uma variedade de métodos *in vitro* (Schwab et al., 2003). A degradação ruminal da proteína é descrita frequentemente por modelos de ação de massas de primeira ordem, os quais consideram que a PB dos alimentos é constituída de diversas frações, cada uma com diferentes taxas de degradação e que o desaparecimento da proteína é o resultado de dois processos simultâneos, degradação e passagem (NRC, 2001).

Atualmente, o método mais usado para se estimar a degradabilidade da proteína no rúmen é o *in situ*, que envolve a incubação de sacos de náilon contendo amostras de alimentos ou dietas no rúmen de animais canulados e ferramentas matemáticas para transformar os dados de desaparecimento ruminal em valores denominados de degradabilidade efetiva (Ørskov e McDonald, 1979). Este modelo é o adotado pelo NRC (1996) nível 1 e pelo NRC (2001) para descrição da degradabilidade ruminal da PB dos alimentos e por meio dele três frações da PB podem ser determinadas (A, B e C). A fração A é considerada 100% degradável no rúmen e inclui o NNP e uma pequena porção da proteína verdadeira rapidamente solubilizada ou de pequenas partículas que escapam dos sacos de náilon. A fração C é a não degradável no rúmen, que passa para o intestino. Ela é obtida após 48 h (alimentos concentrados) ou 72 horas de incubação (forragens) de acordo com a recomendação do NRC (2001). A fração B é a fração insolúvel potencialmente degradável no rúmen, obtida por diferença ( $100 - (A + C)$ ). A degradação desta fração é afetada pela taxa de passagem dos alimentos. A taxa de passagem pode ser determinada com o uso de marcadores ou então estimadas através de equações (NRC, 2001; Seo et al., 2006). Após a determinação das três frações, da taxa de passagem (kp) e da taxa de degradação da fração B (kd), as proporções das frações PDR e PNDR da PB dos alimentos podem ser obtidas a partir das fórmulas:  $PDR = A + B [kd/(kd + kp)]$  e  $PNDR = C + B [kp/(kd + kp)]$ .

Outro modelo bastante difundido para predição da degradabilidade ruminal da proteína é o da Universidade de Cornell, o CNCPS (Cornell Net Carbohydrate and Protein System) (Sniffen et al., 1992; Higgs et al., 2015; Van Amburgh et al., 2015). A determinação das frações proteicas dos alimentos neste modelo é realizada por análises de laboratório. No modelo antigo são definidas cinco frações (Sniffen et al., 1992): A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e C. A fração A representa o NNP, ela é solúvel em tampão borato-fosfato e não

se precipita com ácido tricloroacético (TCA). A fração C refere-se ao conteúdo proteico ligado à FDA. A fração B<sub>1</sub> é solúvel em tampão borato-fosfato, mas se precipita com o TCA. A fração B<sub>3</sub> é obtida pela diferença entre a PB ligada à FDN e a ligada à FDA (C). E a fração B<sub>2</sub> é obtida pela diferença entre o total de PB e a soma das demais frações. Assume-se que a fração A é solubilizada instantaneamente, sendo considerada 100% degradada no rúmen e que sua taxa fracional de degradação tende ao infinito. A fração C não é degradável no rúmen e as demais frações (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>), são potencialmente degradáveis no rúmen e suas taxas de fracionais de degradação variam de 120 a 400%/h, 3 a 16%/h e 0,06 a 0,55%/h, respectivamente, sendo estas determinadas após incubações *in vitro* com proteases. A PDR e a PNDR podem então ser calculadas através da associação das frações da PB obtidas com suas respectivas taxas de passagem e degradação, pelas seguintes fórmulas:  $PDR = A + B_1(kdB1/[kdB1 + kp]) + B_2(kdB2/[kdB2 + kp]) + B_3(kdB3/[kdB3 + kp])$  e a  $PNDR = 1 - PDR$ .

A versão mais recente do CNCPS (Higgs et al., 2015; Van Amburgh et al., 2015) trouxe modificações e atualizações em relação às frações proteicas, resultando em cinco frações: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> e C. As frações solúveis são agora precedidas pela letra A e as insolúveis pela letra B, enquanto a fração C permanece como fração indigestível. Logo as frações solúveis são A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> e as insolúveis B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. A fração A<sub>1</sub> é representada pela amônia e a fração A<sub>2</sub> é constituída por proteína “verdadeira” solúvel. A fração B<sub>1</sub> é constituída por proteína verdadeira insolúvel e a fração B<sub>2</sub> é constituída por proteína ligada a fibra e com potencial de digestão. De acordo com os autores estas mudanças permitem uma melhor descrição do balanço de amônia no rúmen e do suprimento de proteína metabolizável para o animal, pois a proteína metabolizável também é suprida por uma parcela da proteína solúvel, que pela caracterização e diferentes taxas de passagem consideradas no primeiro modelo contribuía principalmente para produção de amônia ruminal.

As taxas fracionais de degradação das frações A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> também foram revistas e novos valores passaram a ser considerados. Para a fração A<sub>1</sub> foi estipulada uma taxa fracional de degradação de 200%/h, para a fração A<sub>2</sub>, de 5 a 50%/h e para as frações B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>, de 3 a 20%/h e de 1 a 18%/h, respectivamente. Segundo os autores as mudanças relacionadas a degradação das frações solúveis se devem ao fato de que no trabalho original (versão antiga) o valor projetado para a taxa de NNP representava a taxa de solubilização e não necessariamente de captação bacteriana, criando uma condição

biológica irreal, além de subestimar o suprimento de proteína metabolizável, oriundo do NNP, para o animal.

#### **1.4. Exigências de proteína para bovinos de corte em terminação**

Por muitos anos para o atendimento das exigências proteicas dos bovinos, as dietas foram formuladas com base em proteína bruta, devido, principalmente, à falta de informação sobre a degradabilidade ruminal e o balanço de aminoácidos tanto das fontes proteicas como das exigências do animal (Santos et al., 1998). Porém, os sistemas proteicos atuais trabalham com modelos de proteína metabolizável, os quais permitem a adequação da dieta tanto em PDR para o atendimento das exigências dos microrganismos ruminais, quanto em proteína metabolizável para o atendimento das exigências dos animais (NRC, 2001; Van Amburgh et al., 2015; NASEM, 2016). A proteína metabolizável é oriunda da digestão intestinal da proteína microbiana e da PNDR, além da proteína endógena, desconsiderada por alguns modelos. Assim, a necessidade de ingestão de proteína bruta é estimada como sendo a quantidade de PDR necessária para o crescimento microbiano, mais a PNDR necessária para complementar o requerimento de proteína metabolizável (para manutenção e ganho) que não foi atingido pela proteína de origem microbiana (NASEM, 2016).

A adequação da PDR, para o atendimento das exigências dos microrganismos ruminais, é de fundamental importância para maximização da eficiência microbiana (Russell et al., 1992). A fração degradável da proteína dá origem a peptídeos, aminoácidos e amônia, que são exigidos para o crescimento das bactérias ruminais; a amônia, porém, não é utilizada pelos protozoários (NRC, 2001). As estimativas da contribuição destes compostos sobre a síntese de proteína microbiana têm sido altamente variáveis. Salter et al. (1979) ao trabalharem com amônia ou ureia N<sup>15</sup> infundidas no rúmen demonstraram que os valores de N microbiano oriundos de amônia variaram de 18 a 100%. Estudos de Nolan (1975) e Leng e Nolan (1984) indicaram que 50% ou mais do N microbiano foi derivado da amônia e o restante de peptídeos e aminoácidos. Maeng e Baldwin (1976) relataram aumento das taxas de crescimento e produção microbiana com a disponibilidade de 75% de ureia e 25% de aminoácidos no rúmen, quando comparado à 100% de ureia.

Um fator importante para maximização da síntese proteica microbiana é que haja disponibilidade de fontes alimentares de proteína e energia no rúmen, se possível com sincronia de degradação. O fornecimento de fontes de NNP (por exemplo, ureia) em



dietas que apresentem baixos teores de carboidratos solúveis e altos teores de carboidratos da parede celular vegetal, pode acarretar em produção de amônia no rúmen que exceda a capacidade de utilização pelos microrganismos, devido a lenta degradação destes carboidratos, e, conseqüentemente, da baixa disponibilidade de energia. A amônia não utilizada para a síntese microbiana é então absorvida através da parede ruminal, sendo convertida à ureia no fígado, processo este que envolve perda de energia. Parte desta ureia produzida no fígado pode retornar para o rúmen por meio da saliva ou corrente sanguínea (difusão através da parede do rúmen), mas a maior proporção é excretada via urina (Van Soest, 1994). Os estudos de Nolan (1975) indicaram que até 25% ou mais do N proteico pode ser perdido desta maneira. Ao contrário, quando grande quantidade de energia é degradada superando a velocidade de degradação da proteína, o excesso de energia é utilizado somente para a manutenção microbiana (Russell, 1998). A baixa disponibilidade do nitrogênio para o crescimento microbiano pode limitar a síntese de proteína microbiana e a digestão dos nutrientes (Devant et al., 2001).

Quando fontes proteicas de alta degradabilidade são associadas a fontes energéticas também de alta degradabilidade ruminal, a sincronização da disponibilidade ruminal de energia e N pode permitir maior eficiência no processo microbiano de fixação da amônia aos esqueletos carbônicos durante a síntese de aminoácidos, diminuindo assim, as perdas de N e energia (Nocek e Russell, 1988). Além disso, o fornecimento de maior quantidade de carboidratos solúveis pode resultar em diminuição do pH ruminal, aumentando a proporção de amônia na forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ ) e diminuindo assim sua absorção pelo epitélio ruminal (Van Soest, 1994).

Como os carboidratos solúveis representam normalmente menos de 10% do total de carboidratos não fibrosos (CNF) dos alimentos, o amido torna-se a principal fonte de carboidratos para o crescimento microbiano (Hoover e Miller-Webster, 1998). A taxa de fermentação de todos os carboidratos determina seu destino no trato digestório e a eficiência com a qual os microrganismos podem utilizá-los (Van Soest et al., 1991). O conhecimento da variação na degradabilidade efetiva das várias fontes de amido que podem ser utilizadas como ingredientes das rações, para sincronizar a disponibilidade de energia e proteína e maximizar a fermentação ruminal, pode ser uma estratégia na formulação de dietas para ruminantes.

Em dietas com alto teor de concentrado, as exigências de PDR podem variar de acordo com o tipo de processamento do grão. Cooper et al. (2002) testaram para animais em terminação dietas com alta proporção de milho (82% da MS) em diferentes

processamentos (laminado, grão úmido e floculado) e ureia como fonte suplementar de N. Foi verificado que as exigências de PDR (% da MS) foram de 6,9%, 7,8% e 7,0% para as dietas contendo milho laminado, grão úmido e floculado, respectivamente.

Vários trabalhos indicam que em dietas de terminação com alto teor de grãos de cereais, a ureia pode ser usada como única fonte suplementar proteica ou substituir maior parte das fontes de proteína verdadeira sem comprometer o desempenho dos animais (Barajas e Zinn, 1998; Gleghorn et al., 2004; Corte et al., 2018), pois, além da adequação da PDR permitida pela ureia, os grãos de cereais da dieta podem contribuir significativamente para o fluxo intestinal de PNDR (Zinn e Owens, 1983; Sindt et al., 1993; NASEM, 2016). Entretanto, em silagens de RTM, aonde todos os ingredientes são ensilados, parte significativa da proteína verdadeira contida na dieta é convertida em proteína solúvel e, subsequentemente, em amônia (Benton et al., 2005), provavelmente, reduzindo o fluxo intestinal de proteína metabolizável. Deve-se ressaltar que com a maior digestibilidade ruminal do amido haverá aumento na síntese de proteína microbiana no rúmen, mas este aumento pode não ser suficiente para compensar a perda de proteína verdadeira durante a fermentação no silo. Consequentemente, o potencial de ganho de peso a partir do aporte de proteína metabolizável pode ficar defasado em relação ao potencial de ganho de peso gerado pelo consumo de energia (Tabela 1).

Tabela 1 – Simulação de fluxo diário de proteína e ganho de peso diário em tourinhos Nelore em terminação (PV inicial 380 kg, PV final 550 kg), utilizando equações de NASEM (2016) e Owens et al. (2014)

| Item                         | NASEM (2016) |              | Owens et al. (2014) |              |
|------------------------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|
|                              | RTM fresca   | RTM ensilada | RTM fresca          | RTM ensilada |
| Consumo de PB, g/d           | 1250         | 1250         | 1250                | 1250         |
| Fluxo PM microbiana, g/d     | 425          | 472          | 413                 | 451          |
| Fluxo PM dietética, g/d      | 230          | 164          | 290                 | 145          |
| Fluxo total PM, g/d          | 655          | 636          | 703                 | 596          |
| Exigência PM, g/d            | 640          | 696          | 640                 | 696          |
| Balanco PM, g/d              | +16          | -60          | +63                 | -100         |
| GMD potencial proteína, kg/d | 1,361        | 1,309        | 1,587               | 1,114        |
| GMD potencial energia, kg/d  | 1,287        | 1,603        | 1,287               | 1,603        |
| Δ GMD potencial, g/d         | +74          | -294         | +300                | -489         |

Composição da dieta: 13% bagaço de cana, 75,8% milho moído, 8% caroço de algodão, 2% minerais+vitaminas+aditivos e 1,2% ureia. Assumiu-se CMS de 10 kg/d. Valores de NDT considerados para o milho seco de 82% e ensilado de 92%. Considerou-se aumento de 10% na degradabilidade ruminal da PB na dieta ensilada.

PB: proteína bruta; PM: proteína metabolizável; GMD: ganho de peso médio diário;  $\Delta$  GMD potencial = GMD potencial proteína - GMD potencial energia.

Com base nestes modelos de predição a suplementação de silagens de RTM com fontes de proteína verdadeira (ex. farelo de soja) pode compensar as perdas que ocorrem durante a fermentação, aumentar o fluxo intestinal de PNDR (proteína metabolizável) e melhorar o desempenho dos animais.

### **1.5. Nitrogênio não proteico e proteína verdadeira para bovinos de corte em terminação**

A ureia é a principal fonte de nitrogênio não proteico (NNP) utilizada nas dietas de animais em terminação. O uso da ureia permite a fácil adequação da PDR da dieta, pelo fato dela ser 100% degradável no rúmen (Sniffen, 1974), além da diminuição do custo da suplementação proteica (Santos e Pedroso, 2011). Em revisão de literatura, Chalupa (1968) sugeriu que em geral a suplementação com ureia é eficiente quando não ultrapassa 1% da MS total da dieta. Em dietas à base de sorgo floculado (67,5 a 69,1% da MS), Duff et al. (2003) observaram que a inclusão de ureia em níveis de 1,0% até 1,75% da MS em substituição ao farelo de soja não comprometeu o desempenho dos animais.

Apesar da ureia poder ser usada como única fonte suplementar proteica em dietas para terminação, como já mencionado anteriormente, alguns trabalhos mostram que a suplementação com farelo de soja, em dietas à base de grãos de cereais, levou a melhores resultados de desempenho dos animais quando comparada a suplementação com ureia. Milton et al. (1997) compararam a suplementação com ureia ou farelo de soja em dois níveis de contribuição de N por cada uma destas fontes (1,93 e 2,24% da MS), em dietas com alto teor de milho laminado na MS (76,5 a 85,7%), e relataram que os animais que receberam farelo de soja nas dietas apresentaram maior ganho de peso diário (+13%) e apresentaram eficiência alimentar superior (9%) que os animais que receberam ureia nas dietas. Resultados similares foram encontrados por Clarindo et al. (2008), que também testaram farelo de soja ou ureia como fontes suplementares de proteína em dietas a base de milho moído ou sorgo moído (70,3 a 76% da MS). O ganho de peso e a eficiência alimentar foram superiores para os animais suplementados com o farelo de soja, sendo 18 e 21% maiores, respectivamente. Os autores acreditam que estes resultados sejam pelo

fato de o farelo de soja ter promovido um maior aporte de PNDR para o intestino, complementando a proteína microbiana e consequentemente aumentando a quantidade de proteína metabolizável para o animal.

Entre as fontes de proteína verdadeira, o farelo de soja é um dos suplementos proteicos mais usados em todo o mundo, por isso tem sido usado como ingrediente básico a ser comparado com outras fontes de proteína (Santos et al., 1998). Além do farelo de soja, grãos de soja, farelos de amendoim, girassol, canola e o farelo de glúten de milho, comercialmente conhecido como refinasil ou promil, são algumas das fontes proteicas empregadas nas dietas de terminação, com fração significativa de PDR. Farelo de algodão, grãos destilados, grãos de soja tostados, resíduo de cervejaria, farelo de soja tratado quimicamente ou termicamente são exemplos de fontes mais ricas em PNDR (Santos e Pedroso, 2011).

Perry e Cecava (1995) relataram que em dietas para animais em terminação com alto teor de grãos, principalmente milho, a suplementação com fontes de PNDR poderia reduzir o desempenho animal em comparação à suplementação com farelo de soja (rico em PDR). Isto ocorreria pela diminuição da concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen e talvez de aminoácidos e peptídeos, o que limitaria a síntese de proteína microbiana. A inclusão de fontes ricas em PNDR em substituição parcial ou total ao farelo de soja pode apresentar resposta positiva com a adequação de PDR na dieta. Se o teor de PDR for limitante devido à adição das fontes ricas em PNDR, a redução no fluxo intestinal de proteína microbiana contrabalança o maior fluxo da proteína de origem alimentar, anulando os benefícios desta prática (Santos et al., 1998).

Dietas formuladas com valores próximos de PNDR não necessariamente resultam em desempenho animal similar, por causa da qualidade da fonte proteica em termos de balanço de aminoácidos essenciais (Klemesrud et al., 2000). O balanço de aminoácidos essenciais de cada fonte deve ser levado em consideração e não apenas o fator degradabilidade. Os sistemas proteicos atuais permitem adequar o perfil de aminoácidos na proteína metabolizável (NRC, 2001; Van Amburgh et al., 2015; NASEM 2016). Entretanto, as características únicas do metabolismo intermediário, além da complexa transformação do alimento durante a fermentação ruminal e as dificuldades de se determinar os aminoácidos disponíveis para absorção no duodeno, representam um desafio para se formular dietas com base nas exigências de aminoácidos para bovinos (Silva et al., 2002)

## 1.6. Suplementação lipídica para bovinos de corte em terminação

As fontes lipídicas possuem alto valor energético, apresentando valor de energia líquida superior à do milho (NASEM, 2016). Logo, a inclusão destas fontes nas dietas tem como principal objetivo aumentar a densidade energética das mesmas, além disso, ainda fornecem ácidos graxos essenciais aos animais, que são compostos de extrema importância na composição das membranas celulares e como precursores das moléculas regulatórias no organismo (Palmquist e Mattos, 2011)

Os óleos de origem vegetal (soja, milho, girassol, canola) e as próprias sementes oleaginosas, como o grão de soja, girassol e o caroço de algodão, são exemplos de fontes lipídicas utilizadas nas rações. Atualmente, o caroço de algodão é a principal fonte de lipídios utilizada nas dietas para bovinos em terminação no Brasil (Pinto e Millen, 2018), devido a sua flexibilidade na formulação da dieta, fornecendo gordura, fibra e proteína (Cranston et al., 2006). A soja é outra oleaginosa que se destaca no país em virtude de sua grande disponibilidade, além disso, apresenta uma boa composição nutricional. Segundo Valadares Filho et al. (2006) o grão de soja é composto por 39% de PB, 19,8% de EE e 84,5% de NDT na MS. Desse modo, o grão de soja pode ser incluso nas dietas para bovinos em terminação com o intuito de se substituir total ou parcialmente fontes proteicas comumente usadas e também de aumentar o teor de gordura e a densidade energética das dietas.

Em algumas circunstâncias, a suplementação da dieta com lipídios pode afetar a fermentação ruminal. Os efeitos da gordura sobre a fermentação ruminal diferem entre fontes e níveis de suplementação e são bastante variáveis devido à complexidade dos fatores que interferem nas respostas. Esta variabilidade dos efeitos das fontes lipídicas sobre a fermentação é em grande parte atribuída ao grau de instauração dos ácidos graxos, pois ácidos graxos insaturados exercem maior inibição sobre os microrganismos ruminais que os ácidos graxos saturados (Palmquist e Jenkins, 1980).

Os ácidos graxos insaturados são tóxicos à microbiota ruminal e por isso os microrganismos desenvolveram um mecanismo de autodefesa chamado de biohidrogenação. No processo de biohidrogenação, as bactérias ruminais transferem hidrogênio para as ligações duplas, transformando os ácidos graxos insaturados em saturados, que são conseqüentemente menos tóxicos (Palmquist e Mattos, 2011).

Mesmo com esse processo realizado pelos microrganismos, altas inclusões de gordura na dieta podem ainda alterar os padrões de fermentação ruminal, prejudicando a degradação ruminal e digestibilidade dos demais componentes da dieta. Altas

concentrações de gordura na dieta podem reduzir a taxa e extensão da digestão da fibra (Plascencia et al., 2003). A redução da digestibilidade da fração fibrosa dos alimentos ocasionada pela gordura pode limitar o consumo de MS, devido ao maior tempo de retenção da fração fibrosa no rúmen e, conseqüentemente, da menor taxa de passagem no trato gastrointestinal, além disso, essa redução na digestibilidade da fibra pode ser acompanhada pela redução na digestibilidade de outros nutrientes, o que compromete o valor energético da dieta (Zinn et al., 1994). Isto pode ter importância nas dietas que são usadas para terminação em alguns confinamentos do Brasil, onde o percentual de inclusão de fontes de forragem é maior do que em dietas de terminação norte americanas (Pinto e Millen, 2018).

Diminuições no consumo de MS de bovinos em terminação são comuns e tipicamente associadas com o aumento do teor de gordura das dietas, devido ao aumento do conteúdo de energia líquida das mesmas (Zinn e Shen, 1996; Ramirez e Zinn, 2000; Shah et al., 2006). Por outro lado, o aumento da densidade energética da dieta está associado à um aumento no ganho médio diário (GMD) e na eficiência alimentar (Zinn, 1988, 1989; Bock et al., 1991) ou somente na eficiência (Krehbiel et al., 1995; Zinn e Shen, 1996; Ramirez e Zinn, 2000). Em revisão de literatura, Krehbiel et al. (2006) afirmaram que o CMS é diminuído, mas a eficiência alimentar é maximizada quando o teor de gordura na dieta representa de 6 a 7% da MS, acima deste nível a eficiência alimentar frequentemente diminui.

### **1.7. Valor alimentício de RTM ensilada para ruminantes**

Os primeiros estudos que reportam sobre a utilização de silagens de RTM na alimentação de ruminantes foram publicados entre as décadas de 60 e 70 (Owen e Howard, 1965; Marshall e Voigt, 1975; Hibbs e Conrad, 1976). Desde os estudos pioneiros, a ensilagem de RTM formuladas com grãos de cereais tem sido associada ao aumento de eficiência alimentar.

Hibbs e Conrad (1976) comparam o desempenho de vacas de leite alimentadas com RTM fresca ou ensilada. As dietas foram misturadas mantendo-se a proporção de 0,45 kg de concentrado por 3,18 kg de silagem de planta inteira de milho (base de MN). O teor de PB do concentrado foi de 29,1%, sendo este composto por 57,32% de milho, 30,00% de farelo de soja, 5,00% de alfafa desidratada, 3,52% de ureia, 3,20% de farinha de ossos e 0,96% de sal. Ambas as dietas continham 14% de PB. A digestibilidade da MS no trato total aumentou (76,7% vs. 79,1%) e o CMS diminuiu (18,1 vs. 16,3 kg/d) para as vacas

alimentadas com a silagem de RTM, porém, a produção de leite foi similar (18,8 vs. 19,0 kg/d). Não houve diferença no teor de gordura do leite e na produção de leite corrigida para gordura (LCG) entre os tratamentos (18,3 vs. 18,7 kg/d). Portanto, a eficiência alimentar foi superior para as vacas alimentadas com silagem de RTM (1,01 vs. 1,15 LCG/CMS para RTM fresca e ensilada, respectivamente).

Em outro estudo, Hibbs e Conrad (1976) utilizaram a mesma proporção de silagem de milho e concentrado do ensaio anterior, para comparação das RTM (fresca e ensilada), mas alteraram a composição do concentrado (40,80% de milho, 50,00% de farelo de soja, 5,00% de alfafa desidratada, 3,20% de farinha de ossos e 1,00% de sal). O teor de PB das dietas foi similar ao do primeiro ensaio (14%). Assim como no primeiro ensaio, o CMS foi menor (17,1 vs. 15,6 kg/d) e a eficiência alimentar foi maior (1,17 vs. 1,32 LCG/CMS) para as vacas alimentadas com a RTM ensilada, sem diferenças para a produção de LCG (19,9 vs. 20,4 kg/d, para RTM fresca e ensilada, respectivamente).

Pardue et al. (1975) avaliaram o efeito da ensilagem sobre o valor nutritivo de uma RTM para vacas de leite. Dois grupos de dez vacas Holandesas (aproximadamente 84 d pós-parto) foram distribuídas em um delineamento “switchback” com três períodos de 28 d cada, para comparar a RTM ensilada com os mesmos ingredientes frescos (silagem e concentrado) fornecidos separadamente em cada ordenha (controle). Embora o desempenho tenha sido similar, a concentração ruminal de AGV foi maior nas vacas alimentadas com RTM ensilada (85,4 vs. 95,2 mM, para controle e RTM ensilada, respectivamente), sugerindo maior degradabilidade ruminal da silagem de RTM.

Por um certo período o interesse na utilização de RTM ensilada parece ter diminuído, contudo, nos últimos anos o interesse parece ter se renovado em virtude principalmente da grande disponibilidade de subprodutos úmidos da agroindústria. Em 2009, Wongnen et al. avaliaram o valor nutritivo de RTM fresca ou ensilada, contendo caroço de algodão integral ou quebrado, para vacas de leite. Quatro vacas Holandesas multíparas ( $48 \pm 12$  DEL e 450 kg de PV) foram utilizadas em delineamento quadrado latino  $4 \times 4$  (21 d cada período), com 4 tratamentos dietéticos em arranjo fatorial  $2 \times 2$  (RTM fresca ou ensilada  $\times$  caroço de algodão integral ou quebrado). As dietas continham (% de MS): palha de arroz picada (20,0%), mandioca fatiada (40,0%), farelo de soja (7,0%), caroço de algodão (10,0%), grãos secos de destilaria (5,0%), polpa de tomate (5,0%), melão (8,0%), ureia (1,5%), sal (0,5%), concha de ostra (0,3%), fosfato bicálcico (0,2%), premix vitamínico-mineral (0,3%), enxofre (0,2%), sebo (1,0%) e bicarbonato de sódio (1,0%). A composição das dietas foi de aproximadamente 63% de MS, 16% de PB e 69% de NDT.

Os parâmetros de fermentação ruminal (pH,  $\text{NH}_3$  e AGV) e o desempenho foram similares entre os tratamentos (15,5 kg/d de CMS, 18,9 kg/d de LCG, 4,30% de gordura no leite, 3,34% de proteína no leite). Contudo a silagem de RTM ocasionou menor proporção de ácido oleico (C18:1) na gordura do leite (27,0% vs. 24,4% do total de ácidos graxos, para RTM fresca vs. RTM ensilada). Esta resposta provavelmente ocorreu por causa da biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados durante a fermentação da silagem.

Recentemente, Miyaji e Nonaka (2018) compararam a digestão e o desempenho de vacas de leite alimentadas com RTM frescas ou ensiladas. As RTM continham silagem de centeio, polpa de beterraba, farelo de soja, premix vitamínico-mineral, e arroz laminado ou floculado. A ensilagem das RTM aumentou a digestibilidade do amido (91,6 vs. 97,2%) e da MS (72,3 vs. 77,6%), tendeu a aumentar o CMS (22,4 vs. 23,0 kg/d) e resultou em maior produção de leite (36,4 vs. 37,6 kg/d, para as RTM frescas e ensiladas, respectivamente). As concentrações de AGV no rúmen (97,1 vs. 101,8 mM) foram ligeiramente superiores nas vacas alimentadas com as RTM ensiladas. Apesar da maior fermentabilidade ruminal, as vacas alimentadas com as silagens de RTM apresentaram concentrações de  $\text{NH}_3$  no rúmen ligeiramente superiores (7,27 vs. 8,81 mg/dL) e maior excreção de N na urina (124 vs. 152 g/d). Enquanto isso, em comparação às RTM frescas, a secreção diária de proteína do leite foi maior nas vacas alimentadas com as silagens de RTM. O potencial das silagens de RTM para vacas de alta produção foi demonstrado neste estudo.

Apesar do menor número de trabalhos, os efeitos da utilização de RTM ensiladas sobre o desempenho de ovinos e bovinos em crescimento têm sido investigados.

Cao et al. (2010) reportaram os efeitos da ensilagem de RTM sobre o balanço de N, fermentação ruminal, e produção de metano em ovinos. Comparada com a ração fresca, a RTM ensilada apresentou maior teor de energia digestível (13,8 vs. 14,6 MJ/kg de MS) e PB digestível (94 vs 105 g/kg de MS) e contribuiu para a menor excreção fecal de N (8,21 vs. 7,08 g/d). Por outro lado, os ovinos alimentados com a RTM ensilada apresentaram maiores perdas urinárias de N (9,76 vs. 11,81 g/d). Enquanto isso, a retenção de N foi semelhante entre os tratamentos (5,2 g/d). A concentração ruminal de AGV total (2 e 4 h após a alimentação) foi maior nos ovinos alimentados a silagem de RTM (88,4 e 87,4 mM vs. 127 e 116 mM para RTM fresca e ensilada, respectivamente). Comparada à RTM fresca, a RTM ensilada reduziu as emissões de metano em 10 L/d, em 9,84 L por kg de CMS, em 17,3 L por kg de CMS digerível, em 0,54 L por kg de peso



metabólico e em 20,9 J por KJ de consumo de energia bruta. Os autores argumentaram que a menor produção de metano foi por causa da conversão do ácido lático (formado durante a fermentação da silagem) em ácido propiônico, uma reação que consome elétrons no rúmen.

Meenongyai et al. (2017) examinaram o efeito da ensilagem sobre o valor nutritivo de RTM à base de gramínea para bovinos de corte. Trinta novilhos mestiços Zebu × Holandês foram blocados e receberam uma das três dietas experimentais por 188 d. Os tratamentos foram: 1) RTM fresca com capim-Napier fresco, 2) RTM fresca com silagem de capim-Napier e 3) silagem de RTM (contendo o capim-Napier). Para os tratamentos 1 e 2 a forragem e o concentrado foram misturados antes da alimentação dos animais. As dietas experimentais continham (% de MS): capim-Napier (41,15%), polpa de mandioca (6,00%), raspa de mandioca (5,00%), milho (9,97%), farelo de arroz (14,00%), farelo de palma (6,91%), farelo de soja (5,00%), açúcar (9,16%), sal (0,50%), ureia (2,00%) e minerais (0,30%). Na média, as dietas possuíam 47% de MS e 15% de PB. O pH das rações 1, 2 e 3 foram 4,7, 4,0 e 3,5, respectivamente. A digestibilidade da MS no trato total foi menor para a RTM fresca contendo silagem de capim-Napier (60,54%), comparada com a da RTM fresca contendo capim-Napier fresco (71,13%) ou a silagem de RTM (65,51%). O CMS, o GMD e a eficiência alimentar foram similares entre os tratamentos.

## 2. REFERÊNCIAS

- Alves, S. P., A. R. Cabrita, E. Jerónimo, R. J. Bessa, and A. J. Fonseca. 2011. Effect of ensiling and silage additives on fatty acid composition of ryegrass and corn experimental silages. *J. Anim. Sci.* 89:2537-2545. doi:10.2527/jas.2010-3128.
- Annison, E. F. 1956. Nitrogen metabolism in the sheep. Protein digestion in the rumen. *Biochem. J.* 64:705-714. doi:10.1042/bj0640705.
- Arieli, A., A. Ben-Moshe, S. Zamwel, and H. Tagari. 1989. *In situ* evaluation of the ruminal and intestinal digestibility of heat-treated whole cottonseeds. *J. Dairy Sci.* 72:1228-1233. doi:10.3168/jds.S0022-0302(89)79227-4.
- Barajas, R., and R. A. Zinn. 1998. The feeding value of dry-rolled and steam-flaked corn in finishing diets for feedlot cattle: influence of protein supplementation. *J. Anim. Sci.* 76:1744-1752. doi:10.2527/1998.7671744x.
- Barros, M., Fleuri, L. F., and G. A. Macedo. 2010. Seed lipases: sources, applications and properties-a review. *Brazilian J. Chem. Engineering*, 27:15-29. doi:10.1590/S0104-66322010000100002.
- Baumont, R., Y. Arrigo, and V. Niderkorn. 2011. Transformation des plantes au cours de leur conservation et conséquences sur leur valeur pour les ruminants. *Fourrages*. 205: 35-46.
- Beever, D. E., D. J. Thomson, and S. B. Cammell. 1976. The digestion of frozen and dried grass by sheep. *J. Agric. Sci.* 86:443-452. doi:10.1017/S0021859600060974.
- Benton, J. R., T. J. Klopfenstein, and G. E. Erickson. 2005. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Reports*, University of Nebraska, Lincoln. p. 31-33.
- Bock, B. J., D. L. Harmon, R. T. Brandt Jr., and J. E. Schneider. 1991. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. *J. Anim. Sci.* 69:2211-2224. doi:10.2527/1991.6952211x.
- Broderick, G. A. 1998. Can cell-free enzymes replace rumen microorganisms to model energy and protein supply? In: E. R. Deaville, E. Owens, A. T. Adesogan, C. Rymer, J. A. Huntington, and T. L. J. Lawrence, editors, *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Occasional publication No. 22, British Society of Animal Sciences, Edinburgh. p. 99-114.
- Broderick, G. A., R. E. Muck, and T. Pauly. 2013. Relationship between proteolysis in the silo and efficiency of utilization of dietary protein by lactating dairy cows. *Proc. III International Symposium on Forage Quality and Conservation*, Campinas, SP. p. 219-240.
- Broderick, G. A., R. J. Wallace, and E. R. Ørskov. 1991. Control of rate and extent of protein degradation. In: T. Tsuda, Y. Sasaki, and R. Kawashima, editors, *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, Orlando, FL. p. 541-592.
- Broderick, G. A., and W. M. Craig. 1980. Effect of heat treatment on ruminal degradation and escape, and intestinal digestibility of cottonseed meal protein. *J. Nutr.* 110:2381-2389. doi:10.1093/jn/110.12.2381.
- Byers, J. H., C. L. Davis, and C. E. Baylor. 1964. Feeding value of limestone-treated corn silage for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 47: 1062-1064. doi:10.3168/jds.S0022-0302(64)88846-9.
- Cao, Y., T. Takahashi, K. Horiguchi, N. K. Yoshida, and Y. Cai. 2010. Methane emissions from sheep fed fermented or non-fermented total mixed ration containing whole-crop rice and rice bran. *Anim. Feed Sci. Tech.* 157:72-78. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.02.004.

- Cardinault, N., M. Doreau, and P. Nozière. 2004. Fate of carotenoids in the rumen. *Renc. Rech. Ruminants*. 11:82.
- Carter, W. R. B. 1960. A review of nutrient losses and efficiency of conserving herbage as silage, barn dried hay and field cured hay. *J. Br. Grassl. Soc.* 15:220-230. doi:10.1111/j.1365-2494.1960.tb00183.x.
- Chalupa, W. 1968. Problems in feeding urea to ruminants. 27:207-219. doi:10.2527/jas1968.271207x.
- Chen, L., G. Guo, C. Yu, J. Zhang, M. Shimojo, and T. Shao. 2015. The effects of replacement of whole-plant corn with oat and common vetch on the fermentation quality, chemical composition and aerobic stability of total mixed ration silage in Tibet. *Anim. Sci. J.* 86:69-76. doi:10.1111/asj.12245.
- Chen, L., G. Guo, X. J. Yuan, M. Shimojo, C. Yu, and Tao Shao. 2014. Effect of applying molasses and propionic acid on fermentation quality and aerobic stability of total mixed ration silage prepared with whole-plant corn in Tibet. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 27:349-356. doi:10.5713/ajas.2013.13378.
- Clarindo, R. L., F. A. P. Santos, C. M. M. Bittar, H. Imaizumi, N. V. A. Lima, e E. M. Pereira. 2008. Avaliação de fontes energéticas e proteicas na dieta de bovinos confinados em fase de terminação. *Ci. Anim. Bras.* 9:902-910.
- Cotta, M. A., and R. B. Hespell. 1986. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. In: L. P. Milligan, W. L. Grovum, A. Dobson, editors, *Control of digestion and metabolism in ruminants*. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs. p. 122-136.
- Cooper, R. J., C. T. Milton, T. J. Klopfenstein, T. L. Scott, C. B. Wilson, and R. A. Mass. 2002. Effect of corn processing on starch digestion and bacterial crude protein flow in finishing cattle. *J. Anim. Sci.* 80:797-804. doi:10.2527/2002.803797x.
- Corte, R. R., F. O. Brito, P. R. Leme, A. S. C. Pereira, J. E. Freitas Jr., F. P. Rennó, S. L. Silva, L. O. Tedeschi, and J. C. M. Nogueira Filho. 2018. The effects of partial substitution of soybean with urea or slow-release urea on finishing performance, meat quality, and digestion parameters of Nellore steers. *Anim. Prod. Sci.* 58:2242-2248. doi:10.1071/AN16609.
- Cranston, J. J., J. D. Rivera, M. L. Galyean, M. M. Brashears, J. C. Broks, C. E. Markhan, L. J. McBeth, and C. R. Krehbiel. 2006. Effects of feeding whole cottonseed and cottonseed products on performance and carcass characteristics of finishing beef cattle. *J. Anim. Sci.* 84:2186-2199. doi:10.2527/jas.2005-669.
- Custódio, L., G. Morais, J. L. P. Daniel, T. Pauly, and L. G. Nussio. 2016. Effects of chemical and microbial additives on clostridium development in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) ensiled with lime. *Grassland Sci.* 62: 135–143. doi:10.1111/grs.12124.
- Daniel, J. L. P., R. C. Amaral, R. S. Goulart, M. Zopollatto, V. P. Santos, S. G. Toledo Filho, E. H. Cabezas-Garcia, J. R. Lima, M. C. Santos, and L. G. Nussio. 2013. Short-term effects of silage volatile compounds on feed intake and digestion in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 91:2321-2331. doi:10.2527/jas.2012-5657.
- Dehority, B. A., R. R. Johnson, O. G. Bentley, and A. L. Moxon. 1958. Studies on the metabolism of valine, proline, leucine and isoleucine by rumen microorganisms *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* 78:15-27. doi:10.1016/0003-9861(58)90310-2.
- Der Bedrosian, M. C., K. E. Nestor Jr., and L. Kung Jr. 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *J. Dairy Sci.* 95:5115-5126. doi:10.3168/jds.2011-4833.

- Devant, M., A. Ferret, S. Calsamiglia, R. Casals, and J. Gasa. 2001. Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied *in vivo* and *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 79:1944-1953. doi:10.2527/2001.7971944x.
- DeVries, T. J., and R. M. Gill. 2012. Adding liquid feed to a total mixed ration reduces feed sorting behavior and improves productivity of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:2648-2655. doi:10.3168/jds.2011-4965.
- Dewar, W. A., P. McDonald, and R. Whittenbury. 1963. The hydrolysis of grass hemicelluloses during ensilage. *J. Sci. Food Agric.* 14:411-417. doi:10.1002/jsfa.2740140610.
- Ding, W., R. Long, and X. Guo. 2013. Effects of plant enzyme inactivation or sterilization on lipolysis and proteolysis in alfalfa silage. *J. Dairy Sci.* 96:2536-2543. doi:10.3168/jds.2012-6438.
- Duff, G. C., K. J. Malcolm-Callis, M. L. Galyean, and D. A. Walker. 2003. Effects of dietary urea concentration on performance and health of receiving cattle and performance and carcass characteristics of finishing cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 83:569-575. doi:10.4141/A02-100.
- Elgersma, A., G. Ellen, H. Van der Horst, B. G. Muuse, H. Boer, and S. Tamminga. 2003. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. *Anim. Feed Sci. Tech.* 108:191-205. doi:10.1016/S0377-8401(03)00134-2.
- Ferraretto, L. F., R. D. Shaver, S. Massie, R. Singo, D. M. Taysom, and J. P. Brouillette. 2015. Effect of ensiling time and hybrid type on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal *in vitro* starch and neutral detergent fiber digestibility in whole-plant corn silage. *The Professional Animal Scientist* 31:146-152. doi:10.15232/pas.2014-01371.
- Feussner, I., and C. Wasternack. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review Plant Bio.* 53:275-297. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248.
- Foskolos, A., S. Cavini, A. Ferret, and S. Calsamiglia. 2016. Effects of essential oil compounds addition on ryegrass silage protein degradation. *Can. J. Anim. Sci.* 96:100-103. doi:10.1139/cjas-2015-0025.
- Gadge, P. P., S. D. Madhikar, J. N. Yewle, U. U. Jadhav, A. D. Chougale, V. P. Zambare, and M. V. Padul. 2011. Biochemical studies of lipase from germinating oil seeds (*Glycine max*). *American J. Biochem. and Biotechnol.* 7:141-145. doi:10.3844/ajbbsp.2011.141.145.
- Gleghorn, J. F., N. A. Elam, M. L. Galyean, G. C. Duff, N. A. Cole, and J. D. Rivera. 2004. Effects of crude protein concentration and degradability on performance, carcass characteristics, and serum urea nitrogen concentrations in growing and finishing beef steers. *J. Anim. Sci.* 82:2705-2717. doi:10.2527/2004.8292705x.
- Han, L. and H. Zhou. 2013. Effects of ensiling processes and antioxidants on fatty acid concentrations and compositions in corn silages. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:48. doi:10.1186/2049-1891-4-48.
- Hansen, S. L. and J. W. Spears. 2009. Bioaccessibility of iron from soil is increased by silage fermentation. *J. Dairy Sci.* 92:2896-2905. doi:10.3168/jds.2008-1933.
- Hao, W., H. L. Wang, T. T. Ning, F. Y. Yang, and C. C. Xu. 2015. Aerobic stability and effects of yeasts during deterioration of non-fermented and fermented total mixed ration with different moisture levels. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28:816-826. doi:10.5713/ajas.14.0837.
- Harfoot, C. G. 1981. Lipid metabolism in the rumen. In: W. W. Christie, editor. *Lipid metabolism in ruminant animals*. Pergamon Press Ltd., Oxford, UK. p. 21-55.

- Heron, S. J. E., R. A. Edwards, and P. McDonald. 1986. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. *J. Sci. Food Agri.* 37:979-985. doi:10.1002/jsfa.2740371005.
- Heron, S. J. E., R. A. Edwards, and P. Phillips. 1989. Effect of pH on the activity of ryegrass *Lolium multiflorum* proteases. *J. Sci. Food Agri.* 46:267-277. doi:10.1002/jsfa.2740460304.
- Hibbs, J. W., and H. R. Conrad. 1976. Complete ensiled corn rations for lactating dairy cows. In: Ohio Agri. Res. and Dev. Center, Res. Bull. 1089. p. 3-18.
- Higgs, R. J., L. E. Chase, D. A. Ross, and M. E. Van Amburgh. 2015. Updating the CNCPS feed library and analyzing model sensitivity to feed inputs. *J. Dairy Sci.* 98:6340-6360. doi:10.3168/jds.2015-9379.
- Hoffman, P.C., N. M. Esser, R. D. Shaver, W. H. Coblenz, M. P. Scott, A. L. Bodnar, R. J. Schmidt, and R. C. Charley. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94:2465-2474. doi:10.3168/jds.2010-3562.
- Hoon, J. H., and R. Meeske. 2011. The effect of the inclusion of an ionophore as a silage additive on maize silage characteristics. *Grootfontein Agric.* 11:75.
- Hoover, W. H., and T. K. Miller-Webster. 1998. Role of sugars and starch in ruminal fermentation. Proc. Tri-State Dairy Nutrition Conference, Ft. Wayne, IN. p. 1-16.
- Huhtanen, P., M. Rinne, and J. Nousiainen. 2008. Effects of silage soluble nitrogen components on metabolizable protein concentration: A meta-analysis of dairy cow production experiments. *J. Dairy Sci.* 91:1150-1158. doi:10.3168/jds.2007-0323.
- Hurrel, R. F., and R. A. Finot. 1985. Effect of food processing on protein digestibility and amino acid availability. In: J. W. Finely and D. T. Hopkins, editors, Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. p. 233-258.
- Hymes-Fecht, U. C., G. A. Broderick, R. E. Muck, and J. H. Grabber. 2013. Replacing alfalfa or red clover silage with birdsfoot trefoil silage in total mixed rations increases production of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:460-469. doi:10.3168/jds.2012-5724.
- Jaakkola, S., and P. Huhtanen. 1989. The effect of lactic acid on the microbial protein synthesis in the rumen of cattle. *Am. J. Appl. Sci.* 2:398-399. doi:10.5713/ajas.1989.398.
- Jareš, M. 2018. Changes in content of tocopherols during storage of ensiled rehydrated maize grain. Masters Thesis. University of Zagreb, Faculty of Agriculture. 47 p. (in Croatian).
- Jones, B. A., R. D. Hatfield, and R. E. Muck. 1992. Effect of fermentation and bacterial inoculation on lucerne cell walls. *J. Sci. Food Agric.* 60:147-153. doi:10.1002/jsfa.2740600203.
- Jouany, J. P., and K. Ushida. 1999. The role of protozoa in feed digestion. Review. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 12:113-128. doi:10.5713/ajas.1999.113.
- Junges, D., G. Morais, M. H. F. Spoto, P. S. Santos, A. T. Adesogan, L. G. Nussio, and J. L. P. Daniel. 2017. Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *J. Dairy Sci.* 100:9048-9051. doi:10.3168/jds.2017-12943.
- Kalač, P., and V. Kyzlink. 1979. Losses of beta-carotene in red clover in an acid medium during ensiling. *Anim. Feed Sci. Tech.* 4:81-89. doi:10.1016/0377-8401(79)90032-4.
- Kalač, P., and P. McDonald. 1981. A review of the changes in carotenoids during ensiling of forages. *J. Sci. Food Agri.* 32:767-772. doi:10.1002/jsfa.2740320804.

- Kalač, P. 2012. Carotenoids, ergosterol and tocopherols in fresh and preserved herbage and their transfer to bovine milk fat and adipose tissues: A review. *J. Agrobiol.*, 29:1-13. doi:10.2478/v10146-012-0001-7.
- Kemble, A. R. 1956. Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. *J. Sci. Food Agri.* 7:125-130. doi:10.1002/jsfa.2740070206.
- Klemesrud, M. J., T. J. Klopfenstein, and A. J. Lewis. 2000. Metabolizable methionine and lysine requirements of growing cattle. *J. Anim. Sci.* 78:199-206. doi:10.2527/2000.781199x.
- Klosterman, E. W., A. L. Moxon, R. R. Johnson, H. W. Scott, and J. V. Stavern. 1961. Feeding value for fattening cattle of corn silages treated to increase their content of organic acids. *J. Anim. Sci.* 20: 493–496. doi:10.2527/jas1961.203493x.
- Kondo, M., K. Shimizu, A. Jayanegara, T. Mishima, H. Matsui, S. Karita, M. Goto, and T. Fujihara. 2016. Changes in nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of total mixed ration silage stored at different temperatures and periods. *J. Sci. Food Agri.* 96:1175-1180. doi:10.1002/jsfa.7200.
- Kopečný, J., and R. J. Wallace. 1982. Cellular location and some properties of proteolytic enzymes of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1026-1033. doi:10.1128/AEM.43.5.1026-1033.1982.
- Krehbiel, C. R., J. J. Cranston, M. P. McCurdy. 2006. An upper limit for caloric density of finishing diets. *J. Anim. Sci.* 84:E34-E39. doi:10.2527/2006.8413\_suppE34x.
- Krehbiel, C. R., R. A. McCoy, R. A. Stock, T. J. Klopfenstein, D. H. Shain, and R. P. Huffman. 1995. Influence of grain type, tallow level, and tallow feeding system on feedlot cattle performance. *J. Anim. Sci.* 73:2916-2921. doi:10.2527/1995.73102916x.
- Kung Jr., L., P. Williams, R. J. Schmidt, and W. Hu. 2008. A blend of essential plant oils used as an additive to alter silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 4793-800. doi:10.3168/jds.2008-1402.
- Lee, M. R., H. R. Fleming, T. Cogan, C. Hodgson, and D. R. Davies. 2019. Assessing the ability of silage lactic acid bacteria to incorporate and transform inorganic selenium within laboratory scale silos. *Anim. Feed Sci. Tech.* 253:125-134. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.05.011.
- Leng, R. A., and J. V. Nolan. 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 67:1072-1089. doi:10.3168/jds.S0022-0302(84)81409-5.
- Lindqvist, H., E. Nadeau, and S. K. Jensen. 2011. Alpha-tocopherol and  $\beta$ -carotene in legume–grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass Forage Sci.* 67:119-128. doi:10.1111/j.1365-2494.2011.00827.x.
- Liu, Q. H., T. Shao, and Y. F. Bai. 2016. The effect of fibrolytic enzyme, *Lactobacillus plantarum* and two food antioxidants on the fermentation quality, alpha-tocopherol and beta-carotene of high moisture napier grass silage ensiled at different temperatures. *Anim. Feed Sci. Tech.* 221:1-11. doi:10.1016/j.anifeedsci.2016.08.020.
- Liu, Q., Z. Dong, and T. Shao. 2018. Dynamics of change in fermentation and fatty acid profiles in high moisture alfalfa silage during ensiling at different temperatures. *Ciênc. Rural.* 48:1-11. doi:10.1590/0103-8478cr20170605.
- Liu, Q., J. Wu, and T. Shao. 2019. Roles of microbes and lipolytic enzymes in changing the fatty acid profile,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene of whole-crop oat silages during ensiling and after exposure to air. *Anim. Feed Sci. Tech.* 253:81-92. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.04.004.
- Lykos T., and G. A. Varga. 1995. Effects of processing method on degradation characteristics of protein and carbohydrate sources *in situ*. *J. Dairy Sci.* 78:1789-1801. doi:10.3168/jds.S0022-0302(95)76804-7.

- Mackie, R. I., B. A. White, and M. P. Bryant. 1991. Lipid metabolism in anaerobic ecosystems. *Crit. Rev. Microbiol.* 17:449-479. doi:10.3109/10408419109115208.
- Mackie, R. I., R. Aminov, H. R. Gaskins, and B. A. White. 1999. Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. Paper presented at 8<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Maeng, W. J., and R. L. Baldwin. 1976. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: Effects of urea and amino acids over time. *J. Dairy Sci.* 72:2002-2016. doi:10.3168/jds.S0022-0302(76)84253-1.
- Mahadevan, S., J. D. Erfle, and F. D. Sauer. 1980. Degradation of soluble and insoluble proteins by *Bacteroides amylophilus* protease and by rumen microorganisms. *J. Anim. Sci.* 50:723-728. doi:10.2527/jas1980.504723x.
- Malekian, F., R. M. Rao, W. Prinyawiwatkul, W. E. Marshall, M. Windhauser, and M. Ahmedna. 2000. Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. Bulletin number 870, LSU AgCenter, Baton Rouge, LA 70803. p. 1-68.
- Mangan, J. L. 1972. Quantitative studies on nitrogen metabolism in the bovine rumen. The rate of proteolysis of casein and ovalbumin and the release and metabolism of free amino acids. *Br. J. Nutr.* 27:261-283. doi:10.1079/bjn19720092.
- Marshall, S. P., and A. R. Voigt. 1975. Complete rations for dairy cattle. I. Methods of preparation and roughage-to-concentrate ratios of blended rations with corn silage. *J. Dairy Sci.* 58:891-895. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84653-4.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. The biochemistry of silage. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Chalcombe Publ., Aberystwyth, UK.
- McDowell, L. R. 2000. Vitamins in animal and human nutrition. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Iowa State University Press, Iowa City, IA.
- McKersie, B. D. 1985. Effect of pH on proteolysis in ensiled legume forage. *Agronomy J.* 77:81-86. doi:10.2134/agronj1985.00021962007700010019x.
- Meenongyai, W., V. Pattarajinda, A. M. Stelzleni, J. Sethakul, and M. Duangjinda. 2017. Effects of forage ensiling and ration fermentation on total mixed ration pH, ruminal fermentation and performance of growing Holstein-Zebu cross steers. *Anim. Sci. J.* 88:1372-1379. doi:10.1111/asj.12797.
- Meschy, F., R. Baumont, J. P. Dulphy, and M. O. Nozières. 2005. Effect of conservation on the major mineral concentration of forages. *Renc. Rech. Ruminants* 12:116.
- Milton, C. T., R. T. Brandt Jr., and E. C. Titgemeyer. 1997. Effects of dietary source and concentration in high-grain diets on finishing steer performance and nutrient digestion. *J. Anim. Sci.* 75:2813-2823. doi:10.2527/1997.75102813x.
- Miyaji, M., H. Matsuyama, K. Hosoda and K. Nonaka. 2012. Effect of replacing corn with brown rice grain in a total mixed ration silage on milk production, ruminal fermentation and nitrogen balance in lactating dairy cows. *J. Anim. Sci.* 83:585-593. doi:10.1111/j.1740-0929.2011.00996.x.
- Miyaji, M., H. Matsuyama, and K. Nonaka. 2017. Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and *in situ* ruminal degradation characteristics of diet. *Animal Science Journal* 88:134-139. doi:10.1111/asj.12610.
- Miyaji, M., and K. Nonaka. 2018. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:5092-5101. doi:10.3168/jds.2017-13802.
- Müller, C. E., J. Möller, S. K. Jensen, and P. Udén. 2007. Tocopherol and carotenoid levels in baled silage and haylage in relation to horse requirements. *Anim. Feed Sci. Tech.* 137:182-197. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.10.007.

- Nadeau, E., B. Johansson, S. K. Jensen, and G. Olsson. 2004. Vitamin content of forages as influenced by harvest and ensiling techniques. Proc. 20<sup>th</sup> General Meeting of the European Grassland Federation, Luzern, CH. p. 891-893.
- NASEM. 2016. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Nutrient requirements of beef cattle. 8<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- NRC. 1985. Ruminant nitrogen usage. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox. Lehninger principles of biochemistry. 6<sup>th</sup> rev. ed. W. H. Freeman & Co, New York, NY.
- Ning, T., H. Wang, M. Zheng, D. Niu, S. Zuo, and C. Xu. 2017. Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 30:171-180. doi:10.5713/ajas.16.0046.
- Nishino, N., H. Harada, E. Sakaguchi. 2003. Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers' grains ensiled alone or in combination of various feeds as a total mixed ration. J. Sci. Food Agric. 83:557-563. doi:10.1002/jsfa.1395.
- Nishino, N., H. Hattori, H. Wada, and E. Touno. 2007. Biogenic amine production in grass, maize and total mixed ration silages inoculated with *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. J. Applied Microbiol. 103:325-332. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03244.x.
- Nocek, J. E., and J. B. Russell. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. J. Dairy Sci. 71:2070-2107. doi:10.3168/jds.S0022-0302(88)79782-9.
- Nolan, J. V. 1975. Quantitative methods of nitrogen metabolism in sheep. In: I. W. McDonald, and A. C. I. Warner, editors, Digestion and metabolism in the ruminant. University of New England Publishing Unit, Armidale, AU. p. 416-431.
- Nozière, P., B. Graulet, A. Lucas, B. Martin, P. Grolier, and M. Doreau. 2006. Carotenoids for ruminants: From forages to dairy products. Animal feed Sci. Tech. 131:418-450. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.018.
- Nugent, J. H., and J. L. Mangan. 1978. Ruminal proteolysis of fraction I leaf protein, casein, and bovine serum albumin. Proc. Nutr. Soc. 37:48A.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92:499-503. doi:10.1017/S0021859600063048.
- Oshima, M. and P. McDonald. 1978. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. J. Sci. Food Agri 29:497-505. doi:10.1002/jsfa.2740290602.
- Owen, F. G., and W. T. Howard. 1965. Effect of ration moisture level on value of alfalfa plus cracked corn as a complete-feed silage for lactating cows. J. Dairy Sci. 48:1310-1314. doi:10.3168/jds.S0022-0302(65)88454-5.
- Pahlow, G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. Elferink, and S. F. Spoelstra. 2003. Microbiology of ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, editors, Silage science and technology. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Society of America; Madison, WI. p. 31-94.
- Palmquist, D. L., and T. C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: review. J. Dairy Sci. 63:1-14. doi:10.3168/jds.S0022-0302(80)82881-5.



- Palmquist, D. L., e W. R. S. Mattos. 2011. Metabolismo de lipídios. In: T. T. Berchielli, A. Vaz Pires e S. G. Oliveira, editores, *Nutrição de ruminantes*. Funep, Jaboticabal, SP. p. 299-322.
- Pardue, F. E., O. T. Fosgate, G. D. O'Dell, and C. C. Brannon. 1975. Effects of complete ensiled ration on milk production, milk composition, and rumen environment of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 58:901-906. doi:10.3168/jds.S0022-0302(75)84655-8.
- Perry, T. W., and M. J. Cecava. 1995. *Beef cattle feeding and nutrition*. 2<sup>nd</sup> ed. Acad. Press, San Diego, CA.
- Pinto, A. C. J., and D. D. Millen. 2018. Nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists: the 2016 Brazilian survey. *Can. J. Anim. Sci.* 99:392-407. doi:10.1139/cjas-2018-0031.
- Plascencia, A. G., D. Mendoza, C. Vásquez, and R. A. Zinn. 2003. Relationship between body weight and level of fat supplementation on fatty acid digestion in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81:2653-2659. doi: 10.2527/2003.81112653x.
- Ramirez, J. E., and R. A. Zinn. 2000. Interaction of dietary magnesium level on the feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 78:2072-2080. doi:10.2527/2000.7882072x.
- Restelatto, R., C. O. Novinski, L. M. Pereira, E. P. A. Silva, D. Volpi, M. Zopollatto, P. Schmidt, and A. P. Faciola. 2019. Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. *J. Anim. Sci.* 97:1634-1644. doi:10.1093/jas/skz030.
- Rooke, J. A., A. O. Akinsoyinu, and D. G. Armstrong. 1983. The release of mineral elements from grass silages incubated in sacco in the rumens of Jersey cattle. *Grass Forage Sci.* 38:311-316. doi:10.1111/j.1365-2494.1983.tb01654.x.
- Rooke, J. A. and R. D. Hatfield. 2003. Biochemistry of ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, editors, *Silage science and technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Society of America; Madison, WI. p. 95-139.
- Russell, J. B., D. J. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577. doi:10.2527/1992.70113551x.
- Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963. doi:10.2527/1998.7671955x.
- Salter, D. N., K. Daneshaver, and R. H. Smith. 1979. The origin of nitrogen incorporated into compounds in the rumen bacteria of steers given protein- and urea-containing diets. *Br. J. Nutr.* 41:197-209. doi:10.1079/bjn19790026.
- San Emeterio, F., R. B. Reis, W. E. Campos, and L. D. Satter. 2000. Effect of coarse or fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2839-2848. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75184-8.
- Santos, F. A. P., e A. M. Pedroso. 2011. Metabolismo de proteínas. In: T. T. Berchielli, A. Vaz Pires e S. G. Oliveira, editores, *Nutrição de ruminantes*. Funep, Jaboticabal, SP. p. 265-297.
- Santos, F. A. P., J. E. P. Santos, C. B. Theurer, and J. T. Huber. 1998. Effects of rumen-undegradable protein on dairy cow performance: a 12-year literature review. *J. Dairy Sci.* 81: 3182-3213. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75884-9.
- Scherer, R., K. Gerlach, and K.-H. Südekum. 2015. Biogenic amines and gamma-amino butyric acid in silages: Formation, occurrence and influence on dry matter intake and ruminant production. *Anim. Feed Sci. Tech.* 210:1-16. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.10.001.

- Schingoethe, D. J. 2017. A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:10143-10150. doi:10.3168/jds.2017-12967.
- Schlegel, P., U. Wyss, Y. Arrigo, and H. D. Hess. 2018. Changes in macro-and micromineral concentrations in herbage during the harvesting and conservation processes. *Grass Forage Sci.* 73:918-925. doi:10.1111/gfs.12382.
- Schmidt, P., R. Restelatto, and M. Zopollatto. 2017. Ensiling total mixed rations - an innovative procedure. Proc. V International Symposium on Forage Quality and Conservation, Piracicaba, SP. p. 7-20.
- Schwab, C. G., T. P. Tylutki, R. S. Ordway, C. Sheaffer, and M. D. Stern. 2003. Characterization of proteins in feeds. *J. Dairy Sci.* 86:E88-E103. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)74042-9.
- Senger, T., T. Wichard, S. Kunze, C. Göbel, J. Lerchl, G. Pohnert, and I. Feussner. 2005. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biological Chem.*, 280:7588-7596. doi:10.1074/jbc.M411738200.
- Seo, S., L. O. Tedeschi, C. Lanzas, C. G. Schwab, and D. G. Fox. 2006. Development and evaluation of empirical equations to predict feed passage rate in cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.* 128:67-83. doi:10.1016/j.anifeeds.2005.09.014.
- Shah, M. A., P. S. Mir, J. L. Aalhus, J. Basarab, and E. K. Okine. 2006. Effect of sunflower seed inclusion in finishing diets for steers on performance, carcass characteristics, muscle and adipose fatty acid composition and meat quality. *Can. J. Anim. Sci.* 86:37-48. doi:10.4141/A05-040.
- Silva, F. F., S. C. Valadares Filho, L. C. V. Ítavo, C. M. Veloso, R. F. D. Valadares, P. R. Cecon, P. V. R. Paulino, e E. B. K. Moares. 2002. Composição corporal e requisitos energéticos e proteicos de bovinos nelore, não-castrados, alimentados com rações contendo diferentes níveis de concentrado e proteína. *R. Bras. Zootec.* 31:503-513. doi:10.1590/S1516-35982002000200027.
- Sindt, M. H., R. A. Stock, T. J. Klopfenstein, and B. A. Vieselmeyer. 1993. Protein sources for finishing calves as affected by management system. *J. Anim. Sci.* 71:740-752. doi:10.2527/1993.713740x.
- Sniffen, C. J. 1974. Nitrogen utilization as related to solubility of NPN and protein in feeds. Proc. of Cornell Nutrition Conference, Cornell University, Ithaca, NY. p. 12-18.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70:3562-3577. doi:10.2527/1992.70113562x.
- Stern, M. D., and L. D. Satter. 1984. Evaluation of nitrogen solubility and the dacron bag technique as methods for estimating protein degradation in the rumen. *J. Anim. Sci.* 58:714-724. doi:10.2527/jas1984.583714x.
- Tagari, H., I. Ascarelli, and A. Bondi. 1962. The influence of heating on the nutritive value of soya-bean meal for ruminants. *Br. J. Nutr.* 16:237-243. doi:10.1079/bjn19620025.
- Tagari, H., F. Pena, and L. D. Satter. 1986. Protein degradation by rumen microbes of heat-treated whole cottonseed. *J. Anim. Sci.* 62:1732-1736. doi:10.2527/jas1986.6261732x.
- Tani, Y., and H. Tsumura. 1989. Screening for tocopherol-producing microorganisms and  $\alpha$ -tocopherol production by *Euglena gracilis* Z. *Agri. Bio. Chem.* 53:305-312. doi:10.1080/00021369.1989.10869324.
- Valadares, R. F. D., G. A. Broderick, S. C. Valadares Filho, and M. K. Clayton. 1999. Effect of replacing alfalfa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis

- estimated from excretion of total purine derivatives. *J. Dairy Sci.* 82:2686-2696. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75525-6.
- Valadares Filho, S. C., P. V. R. Paulino, K. A. Magalhães, M. F. Paulino, E. Detmann, D. S. Pina, e J. A. G. Azevêdo. 2006. Tabelas de composição de alimentos e exigências nutricionais de zebuínos: dados brasileiros. *Anais do V Simpósio de Produção de Gado de Corte e I Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte*. Universidade Federal de Viçosa, MG. p. 47-80.
- Van Amburgh, M. E., E. A. Colleo-Saenz, R. J. Higgs, D. A. Ross, E. B. Recktenwald, E. Raffrenato, L. E. Chase, T. R. Overton, J. K. Mills, and A. Foskolos. 2015. The Cornell Net Carbohydrate System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. *J. Dairy Sci.* 98:6361-6380. doi:10.3168/jds.2015-9378.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583-3597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2<sup>nd</sup> ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Virtanen, A. I. 1933. The AIV method of preserving fresh fodder. *Empire J. Experimental Agri.* 1:143-155.
- Wagner, B. K., B. A. Wenner, J. E. Plank, G. D. Poppy, and J. L. Firkins. 2018. Investigation of ammonium lactate supplementation on fermentation end products and bacterial assimilation of nitrogen in dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 101: 8032-8045. doi:10.3168/jds.2017-14358.
- Wallace, R. J. 1985. Adsorption of soluble proteins to rumen bacteria and the role of adsorption in proteolysis. *Br. J. Nutr.* 53:399-408. doi:10.1079/bjn19850047.
- Wallace, R. J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. *J. Nutr.* 126:1326S-1334S. doi:10.1093/jn/126.suppl\_4.1326S.
- Wang, C., and N. Nishino. 2013. Effects of storage temperature and ensiling period on fermentation products, aerobic stability and microbial communities of total mixed ration silage. *J. Appl. Microbiol.* 114:1687-1695. doi:10.1111/jam.12200.
- Wang, H., T. Ning, W. Hao, M. Zheng, and C. Xu. 2016. Dynamics associated with prolonged ensiling and aerobic deterioration of total mixed ration silage containing whole crop corn. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 29:62-72. doi:10.5713/ajas.15.0319.
- Weinberg, Z. G., Y. Chen, D. Miron, Y. Raviv, E. Nahim, A. Bloch, E. Yosef, M. Nikbahat, and J. Miron. 2011. Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with polyethylene stretch film - A commercial scale experiment. *Anim. Feed Sci. Technol.* 164: 125-129. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.11.016.
- Whitelaw, F. G., T. R. Preston, and G. S. Dawson. 1961. The nutrition of the early-weaned calf. II. A comparison of commercial groundnut meal, heat-treated groundnut meal, and fish meal as the major protein source in the diet. *Anim. Prod.* 3:127-133. doi:10.1017/S0003356100033882.
- Wilkerson, V. A., B. P. Glenn, and K. R. McLeod. 1997. Energy and nitrogen balance in lactating cows fed diets containing dry or high moisture corn in either rolled or ground form. *J. Dairy Sci.* 80:2487-2496. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76201-5.
- Wongnen, C., C. Wachirapakorn, C. Patipan, D. Panpong, K. Kongweha, N. Namsaen, P. Gunun, and C. Yuangklang. 2009. Effects of fermented total mixed ration and cracked cottonseed on milk yield and milk composition in dairy cows. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 22:1625-1632. doi:10.5713/ajas.2009.80668.
- Zinn, R. A. 1988. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. *J. Anim. Sci.* 66:213-227. doi:10.2527/jas1988.661213x.

- Zinn, R. A. 1989. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for feedlot steers: feedlot cattle growth and performance. *J. Anim. Sci.* 67:1029-1037. doi: 10.2527/jas1989.6741029x.
- Zinn, R. A. F. K. Brazle, and T. W. White. 1994. Effects of excessive supplemental fat on feedlot cattle growth performance and digestive function. *Prof. Anim. Sci.* 10:66-72. doi:10.15232/s1080-7446(15)31938-0.
- Zinn, R. A., and F. N. Owens, 1983. Site of protein digestion in steers: Predictability. *J. Anim. Sci.* 56:707-716. doi:10.2527/jas1983.563707x.
- Zinn, R. A., and Y. Shen. 1996. Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 74:2303-2309. doi:10.2527/1996.74102303x.

**II. Effects of protein source and lipid supplementation on the finishing beef cattle performance fed with total mixed ration silages**

(Manuscript style and form consistent with the Instructions for Authors of the Journal of Animal Science)

## ABSTRACT

The objective of this study was to examine the conservation process and feeding value of total mixed ration (TMR) silages. Two experiments were conducted. The objective of the Exp. 1 was to evaluate the fermentation pattern and aerobic stability of TMR silages containing different protein sources and stored by 120 d. The treatments were: ensiled TMR with urea (U); ensiled TMR with no protein supplement (SMnf); ensiled TMR with soybean meal (SM) and ensiled TMR with rolled soybean grain (SG). The experiment was carried out in a completely randomized design and the means of treatments were compared by orthogonal contrasts: U vs. SMnf, SMnf vs. SM and SM vs. SG. The treatment without a protein supplement (SMnf) had lower soluble CP and  $\text{NH}_3\text{-N}$ , pH and clostridia count compared with U ( $P \leq 0.03$ ). Lactic acid concentration tended to be lower for SMnf when compared to U ( $P = 0.09$ ). The ethanol concentration was lower in SG than in SM ( $P < 0.01$ ) and 1,2-propanediol concentration was higher in SMnf than in U ( $P < 0.01$ ), lower in SM than in SMnf ( $P = 0.02$ ) and higher in SG than in SM ( $P = 0.02$ ). The DM loss during fermentation was low (~3.7%) and similar among treatments. All silages remained stable during 10 d of aerobic exposure after silo opening. The objective of Exp. 2 was to evaluate the effects of protein sources and lipid supplementation on the finishing beef heifers' performance. Diets were the same used in Exp. 1, but in the SMnf treatment soybean meal was added at feeding to balance diet CP. Thirty and two Nellore heifers ( $313 \pm 8.8$  kg SBW) were blocked by initial SBW and housed in individual pens for 82 days (21 days for adaptation and 61 days for diet comparison). The daily DMI variation tended to be higher for U when compared to SMnf ( $P = 0.08$ ) and the *Biceps femoris* fat thickness tended to be lower for U than SMnf treatment ( $P = 0.09$ ). The DMI, ADG, final BW, HCW, *Biceps femoris* fat thickness and number of meals per day were higher for SG compared to SM ( $P \leq 0.05$ ).

Fecal pH tended to be lower for SG when compared to SM ( $P = 0.08$ ). Serum total protein concentration was higher for SMnf than U and SM ( $P \leq 0.03$ ). Triglycerides and cholesterol serum levels were higher for SG than SM treatment ( $P \leq 0.05$ ). In brief, the TMR silages showed adequate fermentation pattern and high aerobic stability. The inclusion of true protein source did not improve the animal performance when the whole TMR was ensiled, meanwhile, the soybean grain addition as a lipid source improved the finishing Nellore heifers' performance.

**Key words:** heifers, Nellore, performance, soybean meal, true protein

## INTRODUCTION

Complete or total mixed rations (TMR) are produced by mixing forages, by-products, concentrates, minerals, vitamins and additives. From this mixture of ingredients, animals will be able to consume the necessary nutrients to meet their maintenance and production requirements (Schingoethe, 2017). When consumed as a TMR without sorting of ingredients, more rumen fermentation and a better use of nutrients should occur than feeding separate ingredients (NRC, 2001). Alternatively, to daily preparation, TMR can be ensiled.

Several studies show that ensiled TMR can be well-preserved with minimal dry matter (DM) loss (Weinberg et al., 2011; Chen et al., 2015; Hao et al., 2015; Kondo et al., 2016; Ning et al., 2017). In addition, several benefits have been associated with TMR silages, such as the labor reduction and specialized machinery on farm (if TMR silage is purchased), mixture uniformity and composition, less intensity of particle sorting in the feed bunk due to moisture redistribution (during storage), possibility of conserving wet by-products with greater efficiency and high aerobic stability (Nishino et al., 2003b; Weinberg et al., 2011; DeVries and Gill, 2012; Restelatto et al., 2019).

Improves in ruminal and total-tract starch digestibility have also been reported for ensiled compared with fresh TMR (Miyaji et al., 2017; Miyaji and Nonaka, 2018). Ensiling often increases starch availability, especially in cereals with higher prolamins content in their endosperm (e.g. flint corn, sorghum), due to the proteolysis during silage fermentation (Benton et al., 2005; Hoffman et al., 2011; Der Bedrosian et al., 2012; Junges et al., 2017). In TMR silages, however, all dietary protein is exposed to proteolysis during storage. Increases in diet soluble protein and rumen ammonia concentration were reported for TMR silages compared with fresh TMR (Kondo et al., 2016).



The nutrients changes caused by ensiling can lead to changes in the TMR feeding value fed to ruminants. An increase of diet soluble protein and ammonia concentrations can lead to a lower supply of metabolizable protein (MP) to animals fed TMR silages, even with a possible increase in microbial protein synthesis provided by higher starch degradation in the rumen. A simulation with the current Beef Cattle Nutrient Requirements Model (NASEM, 2016) indicates that ensiling a typical finishing diet (based on dry rolled corn and urea as protein supplement) would change the balance of MP from positive to negative.

Thus, the objective of this study was to examine the conservation process and the feeding value of TMR silages with different protein sources and fat supplementation for finishing beef cattle. In the first experiment, we investigated the TMR silages fermentation traits and aerobic stability. In the second experiment, we investigate if finishing cattle respond to true protein supplementation (i.e. soybean meal) when whole diet is fermented (ensiled TMR), if the true protein source can be added onto the TMR at ensiling or should be supplied at feeding, and if animals respond to a lipid source (rolled soybean grain) in diets with a high proportion of ensiled corn grain.

## **MATERIAL AND METHODS**

### ***Experiment 1***

#### ***Preparing and Ensiling the TMR***

Four experimental TMR with different protein sources were prepared: 1) TMR formulated with urea (U); 2) TMR formulated with soybean meal, but the soybean meal was omitted from mixture at ensiling (SMnf); 3) TMR formulated with soybean meal (SM) and 4) TMR formulated with rolled soybean grain (SG) (Table 1). Before mixing the rations, corn and soybean grain were processed with a roller mill (SEGU 30,

Multiagro Implementos Agrícolas, Porto Alegre, Brazil). Rolled corn had  $2.66 \pm 0.04$  mm and rolled soybean had  $4.10 \pm 0.23$  mm of mean particle size.

Sixteen piles (4 piles per treatment) were prepared individually, mixed manually and packed in experimental silos (7-L plastic buckets) to achieve a density of  $650 \text{ kg/m}^3$  (as fed basis). Fresh water was added onto the rations during mixing to adjust the DM content to 60%. Samples were collected from each pile to determine the fresh TMR composition. After 120 d of fermentation, the silos were weighted to determine fermentative loss and sampled to determine microbial counts, aerobic stability and alterations in chemical composition caused by fermentation.

### ***Aerobic Stability Test***

Aerobic stability of TMR silages was evaluated in a room with controlled temperature ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) during 10 d. Fresh samples of TMR silages were placed in plastic buckets (3 kg) and the temperature was measured every 15 minutes by a datalogger (iMini, Impac Comercial e Tecnologia Ltda, São Paulo, Brazil) placed in the center of the mass. The ambient temperature was measured by two data loggers placed around the buckets. Aerobic stability was defined as the number of the hours that the temperature of the silages remained stable before rising more than  $2^\circ\text{C}$  above the temperature ambient (O'Kiely, 1993).

### ***Laboratorial Analysis***

Aqueous extracts of fresh and ensiled TMR were prepared by mixing 25 g of fresh (wet) sample and 225 g of distilled water for 2 min in a blender and filtering through cheesecloths. After measuring the pH (pH meter model Tec5, Tecnal, Piracicaba, Brazil), an aliquot was frozen at  $-20^\circ\text{C}$  for fermentation products analysis and a second

aliquot was diluted in ringer solution ( $10^{-1}$  to  $10^{-6}$ ) and pour plated in selective media for microbial counts.

Malt extract agar (M137, Himedia, Mumbai, India) acidified to pH 3.5 with lactic acid was used for yeasts and moulds counts. Lactic acid bacteria (LAB) were counted in the Man, Rogosa and Sharpe agar (7543A, Acumedia, Michigan, EUA). The plates were incubated aerobically at 30°C during 2, 3 and 4 d for counting of lactic acid bacteria, yeasts and moulds, respectively. For clostridium and aerobic spores counts, the diluted extracts ( $10^{-1}$  to  $10^{-3}$ ) were pasteurized at 80°C for 10 min. The medium used for clostridium counts was reinforced clostridial agar, with the addition of neutral red and D-cycloserine (Jonsson, 1990). Aerobic spores were enumerated in the plate count agar. The clostridia plates were placed in anaerobic jars and maintained in a biochemical oxygen demand incubator at 37°C for 5 d. The aerobic spores plates were held in the incubator at 34°C and counting was done after 2 d. The number of microorganisms were counted as colony forming unit (cfu) and expressed as log<sub>10</sub>.

The ammonia (Chaney and Marbach, 1962) and lactic acid (Pryce, 1969) concentration were determined by colorimetric methods, using a spectrophotometer (model Janway 6305, Marconi, Piracicaba, Brazil) with wave-lengths of  $\lambda=630$  nm and  $\lambda=565$  nm, respectively. Volatile fatty acids and ethanol were determined by gas chromatography (GCMS QP 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) using a capillary column (Stabilwax, Restek, Bellefonte, PA; 60 m, 0.25 mm  $\phi$ , 0.25  $\mu$ m crossbond carbowax polyethylene glycol).

Fresh and ensiled TMR sub-samples were also collected to evaluate the long-chain fatty acids profile. The samples were dried in a freeze-dryer (ALPHA 1-4 LD plus, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode, Germany) and ground at 0.3 mm sieve using a coffee grinder (DCG-20BKN, Cuisinart, Stamford, USA). The fat was

extracted according to Bligh and Dyer (1959). Fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained in solution of n-heptane and KOH/methanol described by method 5509 of International Organization for Standardization (1978). The FAMES were separated using a gas chromatography (Trace Ultra 3300, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and a SP-2560 cyanopropyl capillary column (100 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness). The gas flow rates used were 2.0 mL/min carrier gas (H<sub>2</sub>), 30 mL/min makeup gas (N<sub>2</sub>), and 35 and 350 mL/min flame gases (H<sub>2</sub> and synthetic air, respectively). The sample (2.0 µL) split ratio was 1:80. The detector and injection port were fixed at 240°C. Initially, the column temperature was maintained at 50°C for 4 min, then raised to 200°C at 10°C/min, and kept at this temperature for 8 min, followed by an increase to 240°C at 5°C/min and maintained for 10 min. Peak areas were determined by the software ChromQuest 5.0. The FAMES were identified by comparing the retention times with those of standard methyl esters. The fatty acids were quantified against tricosanoic acid methyl ester (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), as an internal standard, as described by Joseph and Ackman (1992). Theoretical FID correction factor values were used to calculate the fatty acid concentrations, as described by Visentainer (2012).

Freeze-dried samples ground at 0.3 mm sieve were analyzed for monensin by LC-MS (Blanchflower and Kennedy, 1996) at the Upscience Brasil - Labs Solutions, in Hortolândia, SP, Brazil.

Fresh TMR (d 0) and TMR silages (d 120) sub-sample were dried in an air-forced oven at 55°C for 72 h to determine the DM content and then ground at 1-mm screen using a Wiley mill (Marconi MA340, Piracicaba, Brazil). After grinding, absolute DM was obtained by oven-drying at 105°C (method 934.01) according to AOAC (1990). In dried samples of fresh TMR were determined: the soluble carbohydrates concentration

using the phenol-sulfuric acid method (Hall, 2014), buffering capacity (Weissbach, 1967), fermentability coefficient (Weissbach et al., 1974) and soluble crude protein (CP) (Licitra et al., 1996). The soluble CP concentration was also determined in dried samples of the TMR silages.

### ***Experiment 2***

Animal care and handling procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Use of the Maringa State University (protocol number 4647020718 – CEUA/UEM).

### ***Preparing and Ensiling the TMR***

The rations described in Table 1 were prepared at the Iguatemi Experimental Farm (23°21'13''S, 52°04'27''W; 550 m of altitude) in May of 2018. Before mixing the rations, corn and soybean grains were processed in a roller mill (SEGU 30, Multiagro Implementos Agrícolas, Porto Alegre, Brazil). Rolled corn had  $2.66 \pm 0.04$  mm and rolled soybean had  $4.10 \pm 0.23$  mm of mean particle size. All ingredients were mixed for 5 min in a mixer wagon (VMN 6.0 PA, Nogueira S/A Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista, Brazil) and packed in ag-bag silos (1.8 m diameter, Pacifil, Sapiranga, Brazil) using a bagger machine (SEGU 30, Multiagro Implementos Agrícolas, Porto Alegre, Brazil). Urea (U), soybean meal (SM) or rolled soybean grain (SG) were used to balance the CP in each diet. An additional TMR was balanced with SM, but this ingredient was omitted during mixing and ensiling but it was supplied at feeding (SMnf, where the acronym nf means non-fermented). Fresh water was added during TMR mixing to adjust the DM content of to 60%. All diets were formulated to meet or exceed the nutrient requirements of finishing Nelore heifers (NASEM, 2016) and CP content

was adjusted to reach 13.0% of DM. The ensiled TMR were stored for 120 d before feeding.

### *Animals, Facilities and Collections*

Thirty and two Nellore heifers ( $313 \pm 8.8$  kg BW, 24 mo old) were housed in individual pens with concrete floor, feed bunk and water bowl. The feeding period lasted 82 d, being the first 21 d for adaptation to facilities and high grain diet and the last 61 d for diet comparison. At the end of adaptation period, animals were weighed after 16 h of fasting (during the night), blocked according to the SBW, and randomly assigned to the four dietary treatments (U, SM, SMnf and SG). Every morning, silages were unloaded manually using a fork and offered once daily (09:00 h) in amounts of approximately 5% in excess of daily intake (as fed basis). Feed refusals were collected and weighed daily to determine DM intake (DMI). Daily DMI variation was calculated as the difference among the DMI on the current day and the DMI on the previous day (Bevans et al., 2005). Offered feed and orts were composed weekly to determined DM content and chemical composition.

The SBW was recorded in the beginning of the comparison period and every 28 d. The ADG was determined as the slope of the SBW linear regression on days of diet comparison. Feed efficiency was computed as ADG/DMI. From the individual DMI and ADG data, diet net energy was estimated using the calculations described by Zinn and Shen (1998). Energy requirement for gain was calculated as:  $E_g$  (Mcal/d) =  $(0.0608 \times BW^{0.75}) \times ADG^{1.119}$ , where BW is mean SBW. Energy requirement for maintenance was calculated as:  $E_m$  (Mcal/day) =  $0.077 \times BW^{0.75}$ . Diet net energy for maintenance was estimated by the equation:  $NE_m$  (Mcal/kg DM) =  $((-b - (b^2 - 4ac)^{0.5}) / 2a)$ , where: a = -

$0.877 \times \text{DMI}$ ,  $b = ((0.877 \times \text{Em}) + (0.41 \times \text{DMI}) + \text{Eg})$  and  $c = -0.41 \times \text{Em}$ . Diet net energy for gain was calculated as:  $\text{NEg (Mcal/kg DM)} = (0.877 \times \text{NEm}) - 0.41$ .

Particle size distribution of TMR was determined using a Penn State particle separator (Kononoff et al., 2003). Offered ration andorts were sampled two times during the feeding trial, with 30-d intervals, and the results were pooled. The sorting index was calculated by the observed intake of each fraction retained in each sieve expressed as a percentage of the predicted intake (as fed basis) (Leonardi and Armentano, 2003). Chewing behavior was evaluated at 38d of comparison. Animals were observed every 10 min during 24 h (Maekawa et al., 2002). Chewing activity was obtained by the sum of eating and rumination activities in minutes. The number of meals per day, meal size (obtained dividing DMI by number of meals), meal length (obtained by dividing eating time by number of meals) and intake rate (DMI in g divided by eating time) were also calculated.

Fecal score and pH were evaluated during 4 consecutive days from 45d to 48d of comparison. Four visual scores were considered for feces: 1 = runny: liquid consistency, splatters on impact, spreads readily; 2 = loose: may pile slightly and spreads and splatters moderately on impact and setting; 3 = soft: firm but not hard, piles but spreads slightly on impact and settling; and 4 = dry: hard, dry appearance, original form not distorted on impact and settling (Ireland-Perry and Stallings, 1993). For pH evaluation, fecal samples were collected from fresh feces at two moments (morning and afternoon). A solution was made by mixing 15 g of feces and 100 mL of distilled water (Ireland-Perry and Stallings, 1993) and the pH was recorded after 2 min (pH meter model Tec5, Tecnal, Piracicaba, Brazil). The remaining samples of each sampling period were stored in separate plastic bags and then frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ . At the end of collection period samples within the same pen were composited on an equal wet weight basis, resulting in

approximately 250 g of feces for DM content determination as described for feed samples in Exp. 1.

Blood samples were collected into tubes with or without anticoagulant from the jugular vein of each animal at  $6\pm 1$  h after feeding on 57d of comparison. The samples were immediately centrifuged at  $4,000 \times g$  for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$ . Plasma and serum samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the analysis of urea, total protein, cholesterol and triglycerides using commercial kits (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte, Brazil).

### ***Carcass Traits and Slaughter***

At final weighting, carcass traits were evaluated by ultrasound (Aloka SSD500). Images were collected using a 17 cm, 3.5 MHz probe. Ribeye area and rib fat thickness were measured between the 12th and 13th rib transversally to the *Longissimus* muscle. Marbling score (1 to 10) was recorded from the 11th to 13th rib longitudinally to the *Longissimus* muscle. *Biceps femoris* fat thickness was also recorded. A single trained technician scanned all animals. The images were analyzed using the software Bia Pro Plus (Designer Genes Technology). Afterwards, animals were transported 135 km to a commercial abattoir and slaughtered according to animal welfare and pre-slaughter practices established by the local sanitary inspection. The hot carcass weight (HCW) was recorded, and dressing calculated as HCW/SBW.

### ***Chemical Analysis***

The procedures used to determine the DM content, absolute DM and soluble carbohydrates were the same described in Exp. 1. Ash concentration was determined by complete combustion in a muffle furnace at  $600^{\circ}\text{C}$  for 5 h (AOAC method 942.05), CP



by Kjeldahl was calculated as total N  $\times$  6.25 (AOAC method 984.13) and ether extract (EE; AOAC method 920.29) according to AOAC (1990). Neutral detergent fiber (NDF) was assayed with sodium sulphite and a heat stable amylase (Mertens, 2002) and acid detergent fiber (ADF, Van Soest 1967) was determined sequentially in a Fiber Analyzer (TE-149, Tecnal, Piracicaba, Brazil). The content of non-fiber carbohydrates was calculated as  $NFC = 100 - (CP + NDF + EE + ash)$ .

### ***Protein Degradability***

Ruminal protein degradability was estimated by two methods, the *in situ* and N fractionation (CNCPS method). For the *in situ* assay, ensiled TMR sample were collected, dried at 55°C for 72 h and ground in a Wiley mill (Marconi MA340, Piracicaba, Brazil) with a 5-mm screen and weighed in woven bags (10  $\times$  20 cm; 50  $\mu$ m porosity; Ankon Technology, Macedon, NY, USA). Approximately 5 g was placed in each bag, which were incubated in the rumen of two cannulated crossbred dry cows for 0, 12, 24 and 36 h. Bags were inserted in reverse order and recovered all together. Immediately after removing, bags were submerged in cold water (0°C) for 5 min and washed in a washing machine (three cycles, followed by a final spin). Washed bags were dried in an air-forced oven at 55°C for 72 h, weighed, and their contents were ground through a 1-mm screen using a Wiley Mill for measuring total N concentration by Kjeldahl method. Ruminal degradability was calculated using the first-order approach  $[kd / (kd + kp)]$ . Fractional passage rates (liquid, concentrate and forage) were estimated using DMI, dietary forage level and SBW (Tylutki et al., 2008; NASEM, 2016) values. Forage and concentrate fractional passage rates were used to predict the solids fractional passage, as follows:  $kp \text{ solids} = kp \text{ forage} \times \% \text{ forage in diet} + kp \text{ concentrates} \times \% \text{ concentrates in diet}$ . Ruminal-degraded protein (RDP) of each TMR

was determined as  $RDP (\%) = A (\%) + B (\%) \times [kd/(kd + kp)]$  and rumen-undegraded protein (RUP) determined as  $RUP (\%) = 100 - RDP (\%)$ .

The protein degradability of TMR silages was also estimated based on N fractionation (CNCPS method). Ammonia concentration was determined as described in Exp. 1 (Chaney and Marbach, 1962). Dry samples were ground to pass a 1-mm screen using a Wiley mill (Marconi MA340, Piracicaba, Brazil) to determine soluble protein, acid-detergent insoluble nitrogen (ADIN) and neutral-detergent insoluble nitrogen (NDIN) contents using the methods described by Licitra et al. (1996). After these measures N fractionation was determined using CNCPS v.6.5 (A1, A2, B1, B2 and C fractions) (Van Amburgh et al., 2015). Ruminal degradability was calculated using the first-order approach  $[kd / (kd + kp)]$  (Van Amburgh et al., 2015). Fractional passage rates (liquid, concentrate and forage) were estimated using DMI, dietary forage level and SBW (Tylutki et al., 2008; NASEM, 2016) values. Forage and concentrate fractional passage rates were used to predict the solids fractional passage, as follows:  $k_{p \text{ solids}} = k_{p \text{ forage}} \times \% \text{ forage in diet} + k_{p \text{ concentrates}} \times \% \text{ concentrate in diet}$ . Liquids fractional passage rate was considered for soluble fractions (A1 and A2), whereas the solids fractional passage rate was used for insoluble fractions (B1 and B2). The RDP of each TMR was determined as  $RDP (\%) = A1 (\%) \times (kd/[kd + k_{p \text{ liquids}}]) + A2 (\%) \times (kd/[kd + k_{p \text{ liquids}}]) + B1 (\%) \times (kd/[kd + k_{p \text{ solids}}]) + B2 (\%) \times (kd/[kd + k_{p \text{ solids}}])$ . The RUP was calculated as  $RUP (\%) = 100 - RDP (\%)$ .

From the protein degradability data and energy calculations, the microbial protein and PNDR fluxes were estimated, as well as the protein requirements were calculated according to NASEM (2016).

### ***Statistical Analysis***

Statistical analysis was performed using the SAS (v 9.4) mixed procedures. Silage outcomes were analyzed as a completely randomized design. Means were compared by orthogonal contrasts. The contrasts were U vs. SMnf, SMnf vs. SM and SM vs. SG.

Animal performance was analyzed using a model including a random effect of block and a fixed effect of treatment. Means were compared by orthogonal contrasts. The contrasts were U vs. SMnf, SMnf vs. SM and SM vs. SG. The first contrast was defined to test if the animals respond to true protein source, the second to test if the true protein can be ensiled, and the last contrast to test if the animal respond to fat supplementation in a diet with a high ensiled corn grain proportion. Differences between treatments were declared if  $P \leq 0.05$  and trends considered if  $0.05 < P \leq 0.10$ .

## RESULTS

### *Experiment 1*

In fresh TMR, the pH value was lower for SMnf treatment compared to U treatment ( $P = 0.03$ ), higher for SM compared to SMnF ( $P = 0.02$ ) and higher for SG compared to the SM treatment ( $P < 0.01$ ) (Table 2). The soluble CP concentration were lower for SMnf treatment compared to U ( $P < 0.01$ ) and lower for SM when compared to SMnf ( $P = 0.04$ ). The soluble carbohydrates content tended to be higher for SM when compared to the SMnf treatment ( $P = 0.09$ ) and was higher for SG compared to the SM treatment ( $P < 0.01$ ). The buffering capacity was lower for SMnf treatment when compared to U treatment ( $P < 0.01$ ), higher for SM compared to SMnf ( $P < 0.01$ ) and lower for GS compared to SM ( $P < 0.01$ ). The fermentability coefficient and microbial counts were similar among the treatments ( $P > 0.10$ ). In TMR silages, the soluble CP and  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations, pH and clostridia counts were lower for SMnf treatment when compared to U treatment ( $P \leq 0.03$ ). The lactic acid content tended to be lower for

SMnf compared to U treatment ( $P = 0.09$ ). The ethanol concentration was lower in SG treatment than in SM ( $P < 0.01$ ) and 1,2-propanediol concentration was higher in SMnf compared to U ( $P < 0.01$ ), lower for SM compared to SMnf ( $P = 0.02$ ) and higher for SG compared to SM treatment ( $P = 0.02$ ). There was no difference in lactic acid bacteria, yeasts and aerobic spores counts among treatments ( $P > 0.10$ ). Mould counts were lower than 2 log cfu/g for all treatments. The DM losses were similar among treatments ( $P > 0.10$ ) and all silages remained stable during aerobic exposure (10 d).

The monensin concentration was similar among treatments in fresh and ensiled TMR ( $P > 0.10$ ) (Table 3). In fresh TMR, the C18:0 concentration tended to be lower for SM treatment compared to SMnf ( $P = 0.08$ ), such as the C18:1 cis-9 concentration ( $P = 0.09$ ). For SG treatment the C18:1 cis-9 concentration was lower than the concentration showed by SM ( $P < 0.01$ ). The C18:3 cis-9,12,15 concentration was higher for SM treatment compared to SMnf ( $P < 0.01$ ) and also higher for SG compared to SM ( $P < 0.01$ ). The sum of others fatty acids found in minor proportion tended to be higher for SM compared to SMnf ( $P = 0.08$ ). In TMR silages, the C18:1 cis-9 concentration was lower for SMnf treatment compared to the U ( $P < 0.01$ ), lower for SM compared to SMnf ( $P = 0.02$ ) and also lower for SG compared to SM ( $P < 0.01$ ). The C18:2 cis-9,12 concentration was higher for SMnf treatment compared to U ( $P = 0.02$ ). The C18:3 cis-9,12,15 concentration tended to be higher for SMnf treatment compared to the U ( $P = 0.09$ ) and was higher for SG compared to SM ( $P < 0.01$ ).

## ***Experiment 2***

The TMR silages chemical composition is shown in Table 4. The numerical differences in N fractionation were as follows. The U treatment showed a higher proportion of A1 fraction and a lower proportion of B1 fraction compared to other

treatments. The SMnf treatment showed lower proportions of soluble fractions (A1 and A2) and higher proportion of B1 fraction in relation to other treatments.

The DMI was similar for U, SMnf and SM treatments ( $P > 0.10$ ) and was higher for SG than SM ( $P = 0.03$ ) (Tabela 5). The DMI variation tended to be lower for SMnf when compared to U ( $P = 0.08$ ). Performance and carcass traits were similar among U, SMnf and SM, except the *Biceps femoris* fat thickness that tended to be higher for SMnf when compared to U treatment ( $P = 0.09$ ). The ADG and final BW was higher for SG when compared to SM ( $P = 0.02$ ). Hot carcass weight ( $P = 0.05$ ) and *Biceps femoris* fat thickness ( $P = 0.01$ ) were also higher for SG than SM. Diet energy values were similar among diets ( $P > 0.10$ ).

The number of meals was higher for SG than for SM treatment ( $P = 0.04$ ) (Table 6). Other characteristics of feeding behavior and particle sorting were similar among treatments ( $P > 0.10$ ). There was no difference for fecal score and fecal DM among treatments ( $P > 0.10$ ). Fecal pH tended to be slightly lower for SG when compared to SM ( $P = 0.08$ ). There was no diet effect on plasmatic levels of glucose and urea ( $P > 0.10$ ). The total protein serum concentration was higher for SMnf than U ( $P < 0.01$ ) and lower for SM when compared to SMnf ( $P = 0.03$ ). Animals fed SG treatment showed higher triglycerides ( $P = 0.05$ ) and cholesterol ( $P < 0.01$ ) serum concentration in relation to the animals fed SM treatment.

The RDP supplies estimated by CNCPS or *in situ* methods were higher in relation to the requirements for microbial protein synthesis for all treatments, resulting in positive RDP balances (Table 7). The positive RDP balances of all treatments were higher when RDP supplies were estimated by *in situ* method. The U treatment was the only one that showed negative MP balance when the total MP content was calculated from RDP and RUP values estimated by CNCPS method. When the protein flux was

calculated from RDP and RUP values estimated by *in situ* method, the SMnf treatment was the only one that showed positive MP balances.

## DISCUSSION

### *Experiment 1*

All TMR silages showed low DM loss and high aerobic stability, indicating that they were well preserved. During silage fermentation, the soluble carbohydrates are the main substrate to LAB. In this study, besides the low levels of soluble carbohydrates (<2.1%), all TMR silages fermented properly. All TMR had high DM content (60%), low buffering capacity (18.0 to 23.1) and the initial LAB populations were moderates for all TMR when compared to the values reported in the literature (Rooke, 1990; Lin et al., 1992; Hu et al., 2015). Thus, these factors combined to the adequate silo sealing probably contributed to a satisfactory conservation.

The increase in the soluble CP content of ensiled TMR when compared to the fresh TMR was expected due to proteolysis that occur during the ensiling period, which is an inevitable process, carried out by plant and microbial enzymes (Kemble, 1956; Heron et al., 1986; McDonald et al., 1991). Soluble CP and NH<sub>3</sub>-N high concentration in silages are indicative of an extensive proteolysis and a high NH<sub>3</sub> production is associated with activity of undesirable microorganisms. The free amino acids from protein breakdown are decarboxylated to amines and CO<sub>2</sub> or deaminated to organic acids and NH<sub>3</sub> by enterobacteria and principally clostridia (McDonald et al., 1991). Activity of clostridia in silages results in high DM losses (Pahlow et al., 2003). In addition, amines and NH<sub>3</sub> from amino acids breakdown are considered to be responsible for lowering silage intake by ruminants (Wilkins et al., 1971; Cushnahan et al., 1995; Van Os et al., 1995). As NH<sub>3</sub> is easily measured in the laboratory it is a usual indicative of silage quality.

According to McDonald et al. (1991),  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration below 10% (% total N) is an indicative of well-preserved silages, meanwhile, concentrations above 20% indicate poor silage quality. However, in our study the higher  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration showed by TMR silage containing U (26.7%) compared to the average values of others TMR silages (8.77%) certainly is associated to the inclusion of this ingredient at ensiling, even with a clostridia population slightly superior for this silage. The excessive increase in  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration was probably a result urea hydrolysis to  $\text{NH}_3$ , carried out by urease enzymes during the ensiling period (Lessard et al., 1978). The similar DM losses among the TMR silages confirms this hypothesis.

The higher pH and total acid production showed by TMR with U in this study agree with the results found by Lessard et al. (1978) that included urea as additive at ensiling of whole plant corn (0.6% as fed). The urea conversion to  $\text{NH}_3$ , which contributes to increase the buffering capacity and extends the fermentation, is a plausible explanation for the higher final pH and total acid production in silages (Ely, 1978). The pH is one of the most common measurements for evaluating silage fermentation (Kung et al., 2018). In this study, even the higher pH showed by the TMR silage containing U (4.72) can be considered adequate, because normally the pH of TMR silages ranges from 4.0 to 5.0, depending of the factors as DM content, ingredients, storage temperature and ensiling periods (Wang and Nishino, 2008; Wang and Nishino 2013; Chen et al., 2015; Hao et al., 2015; Kondo et al., 2016; Restelatto et al., 2019).

During an adequate silage fermentation, lactic acid is the most abundant end-product produced by LAB. Homofermentative LAB use water-soluble carbohydrates to produce acid lactic and this process results in a minimal energy and DM losses (Pahlow et al., 2003). In addition, it is well known that the lactic acid is the organic acid that

most contributes to the pH decline in silages and that a low pH inhibits the growth or kill undesirable microorganisms as yeasts, enterobacteria and clostridia, which lead to energy and DM losses (McDonald et al., 1991). Acetic acid is the second acid found in higher concentration and generally the its concentrations in silage crops or TMR silages ranges from 1.0 to 3.0% of DM (Nishino et al., 2003b; Miyaji et al., 2013; Kung et al., 2018; Restelatto et al., 2019). The lactic acid to acetic acid ratio is a commonly indicator used for evaluated silage fermentation and good silage fermentations usually have a ratio of theses acids of about 2.5 to 3.0 (Kung et al., 2018). As expected, in our study the acid lactic was the predominant organic acid in all TMR silages and the overall mean of lactic acid to acetic acid ratio of TMR silages was similar to regular levels (2.44).

The soluble carbohydrates conversion into ethanol results in high DM losses (McDonald et al., 1991), however in this study even the higher value showed by SMnF treatment (0.74%) can be considered low when compared with values reported in the literature (Nishino et al., 2003a; Wang and Nishino, 2008). In relation to the 1,2-propanediol and 2,3-butanediol concentrations, the small amounts of 1,2 propanediol showed by treatments (0.04 to 0.18% of DM) agree with the amounts found in previous works (Danner et al., 2003; Nishino et al., 2004), as well as the overall mean of 2,3-butanediol (0.08%) of treatments (Kasmaei et al., 2013).

Measure microbial populations is also an important indicator of silage fermentation (Kung et al., 2018). In our study, the increase in LAB population and the very low mould population are indicative of well-preserved silages and this together with the others fermentative characteristics explain the DM loss below 4% for all TMR silages.

The aerobic spoilage process is usually initiated by yeasts growth using residual soluble carbohydrates and lactic acid. With the lactic acid consumption by yeasts during



aerobic exposure the silage pH increase and then it becomes suitable for other undesirable microorganisms growth as molds and aerobic bacteria (Pahlow et al., 2003; Muck, 2013). Thereby, low yeasts population in silages crops or TMR silages generally is associated with enhanced of aerobic stability (Nishino et al., 2003a; Chen et al., 2015). A lower yeasts population and consequently the improved in aerobic stability may occur with a prolonged storage period (Restelatto et al., 2019). In our study the yeasts population (3.39 cfu/g) can be considered relatively low in all TMR silages, because silages that contain above  $10^5$  cfu of yeasts/g are the most prone to deteriorate when exposed to air (McDonald et al., 1991). Thus, the low yeasts population can be associated to the high aerobic stability of TMR silages. Probably the prolonged storage period of TMR silages was the factor responsible by the low yeasts population and consequently by high aerobic stability, similar to the reported by Restellato et al. (2019)

Despite of some fatty acids concentration difference among the fresh or ensiled TMR the magnitude of these differences was small and in general the fatty acids profile was similar among them. During the ensiling period is expected an increase in saturated fatty acids in detrimental to unsaturated fatty acids and this occurs due the enzymes action and biohydrogenation performed by some lactic acid bacteria strains (Feussner and Wasternack, 2002; Liu, et al. 2019). Change in fatty acids profile during ensiling occur mainly by lipases and lipoxygenases action, the first cleave the ester bonds of triglycerides releasing glycerol and free fatty acids (Gadge et al., 2011) and the second can oxidize mainly linoleic and linolenic acids (Feussner and Wasternack, 2002; Senger et al., 2005). However, the optimal activity of these enzymes occurs under neutral pH conditions (6.5 to 8.0) (Malekian et al., 2000). In the current trial, the silos were immediately sealed and the rations were, probably, quickly acidified, thus not providing ideal conditions for the oxidation and saturation of fatty acids.

Monensin concentrations were slightly lower in TMR silages (by -6%) compared to fresh TMR, without a marked difference among treatments. It suggests that monensin was partially metabolized during silage fermentation, however the final concentration range was within recommended levels for finishing diets (NASEM, 2016). Despite of this results, further research is warranted to verify if the ingredients and silo management affects monensin recovery in TMR silages.

### ***Experiment 2***

In general, few positive responses were noted when the true protein source supplied before feeding in TMR silage (SMnf) was compared to the NPN source (U). The SMnf treatment lead to a numerical increase of 3.4% in DMI compared to U treatment. The higher DMI for SMnf treatment was associated with its lower NH<sub>3</sub>-N (A1 fraction) proportion. Ammonia-N has decreased silage DMI in sheep (Wilkins et al., 1971), dairy (Cushnahan et al., 1995) or beef cattle (Rook and Gill, 1990), however, it has been suggested that decreased silage DMI is not due to NH<sub>3</sub>-N per se, but to an indirect effect due to NH<sub>3</sub>-N correlation with others variables as silage N compounds proteolysis or VFA which are the causal agents (Rook and Gill, 1990; Huhtanen, 2002). This may explain only the numerical difference in the DMI among the two treatments in our study. Possibly the NH<sub>3</sub>-N was also the responsible by difference in daily DMI variation among the two treatments. Galyean et al. (1992) reported that a daily intake variation of 10% decreased the ADG and G:F of steers compared with a constant amount of feed per day in a programmed-feeding system. In contrast, Soto-Navarro et al. (2000) and Zinn (1994) in programmed-feeding systems did not found differences in steers performance with daily intake variations of 10% and 20%, respectively. Soto-Navarro et al. (2000) also concluded that the steers may become adapted to the 10% intake variation. In this

present study, the daily DMI variation was below of 10% for all treatments (ranging of 5.30 to 6.64%), therefore, despite SMnf treatment led to a lower daily DMI variation compared to U treatment (-20% approximately), the magnitude of variations was low, which may explain the absence of response in performance.

A possible effect of higher MP supply by TMR supplemented with soybean meal was observed in carcass traits, although the dressing and hot carcass weight were only numerically superior for SMnf compared to U. A numerical increase in back fat thickness and a more expressive increase in *Biceps femoris* fat thickness (+19%) were also observed, probably because of numerical increase in DMI and consequently in energy intake, since the diets contained the same NEg content.

The soybean meal (SM) ensiling as part of the TMR was further evidence of the lack of animal response to the true protein supplementation in TMR silage (SMnf). Even with the loss of true protein during silage fermentation, all parameters of growth performance and carcass measured were strictly similar among treatments.

Differences in performance were observed when soybean grain replaced the soybean meal and a small portion of rolled corn to maintain the same protein content and increase the fat content of TMR silage. The increase DMI for SG treatment (+18%) was an uncommon result, because generally cattle fed high grain diets containing supplemental fat source show similar or lower DMI compared to the cattle fed diets without fat source added (Zinn, 1989; Zinn, 1992; Krehbiel et al., 1995; Ramirez and Zinn, 2000). However, feeding supplemental fat to finishing cattle typically improves ADG and G:F (Zinn, 1988, 1989; Brandt and Anderson, 1990) or only G:F (Krehbiel et al., 1995; Zinn and Shen, 1996; Ramirez and Zinn, 2000). These fat supplementation effects are associated with higher diet energy density promoted by fat sources, which can have a net energy value nearly three times higher than corn (NRC, 1996; NASEM

2016). As in this current trial the soybean grain inclusion was not sufficient to improve the diet net energy, due to its lower net energy content compared to the sources used in the experiments cited above, the feed efficiency was not improved and the higher ADG (+21%) was a result of greater DMI.

The hot carcass weight improvement for SG treatment was a response of the higher ADG compared to SM treatment, since the dressing percentage was similar among the treatments. The carcass characteristics results in this study were less consistent compared to the Zinn (1992) results. The author reported higher hot carcass weight, dressing percentage, LM area, KPH, in addition back fat thickness numerically higher for steers fed steam-flaked corn or steam-flaked wheat based diets that contained 6% of supplemental fat as either yellow grease or cottonseed oil compared to the steers fed control diet (no added fat). The carcass traits improvement has been variable with the addition of supplemental fat in diets. Brandt and Anderson (1990) fed steers with flaked milo-based diets containing no added fat or 3.5% supplemental fat as soybean oil, tallow, or yellow grease and reported increased hot carcass weight only in steers supplemented with yellow grease and increased dressing percentage due to supplemental fat, regardless of source. No differences in back fat thickness, marbling score and percent choice were related. Andrae et al. (2001) reported that steers fed high oil corn-based diet had a higher marbling scores compared to those fed conventional corn-based diet, despite the lack of difference in back fat thickness. Similar result was also found by Gillis et al. (2004) in heifers fed dry-rolled corn-based diets supplemented with 4% of corn oil compared to the heifers fed control diet (no added fat). In this current study, even with a back-fat thickness numerically higher for SG compared to the SM the marbling score was similar among treatments. However, the studies cited above were conducted with *Bos taurus* breeds, whereas the animals in our study were Nellore

breed (*Bos indicus*), which is known to have leaner meat and, consequently, less marbling (Marshall, 1994). On the other hand, the *Biceps femoris* fat thickness was other carcass parameter greater for SG treatment compared to SM (+18%) in our study. In addition, the LM area was numerically higher.

As the animals of the SG treatment had higher DMI than the animals of SM treatment the number of meals per day was also higher (10.6 vs. 9.0), as well as the eating, ruminating and chewing activities, although those were only numerically higher. The greater DMI for SG was also associated with slightly lower fecal pH compared with SM treatment (-3.2%). According to Wheeler and Noller (1977) the fecal pH is reliable indicator of intestinal pH. Therefore, the higher feed intake possibly increased the fermentable organic matter passage to the hindgut, stimulating the organic acids formation, which led a pH drop in feces. However, the similar fecal score among all treatments with the values close to 3 (normal consistency) suggest the absence of digestive disturbances.

An effect of true protein supplementation was noted in the blood parameters. The higher concentration of blood total protein in animals that received the SMnf treatment indicated the higher MP supply of TMR supplemented with soybean meal at feeding compared with the ensiled TMR with urea or soybean meal. However, this was not enough to improve the performance. The increase in triglycerides (+20.3%) and cholesterol (+24.6%) serum concentrations for SG treatment compared to SM treatment agree with other studies of beef and dairy cattle, where was demonstrated an increase in triglycerides and cholesterol serum/plasma concentrations with dietary fat inclusion (Choi and Palmquist, 1996; Khorasani and Kenelly, 1998; Bindel et al., 2000; Belal et al., 2017). Similar to our study Schauff et al. (1992) also reported substantial cholesterol blood levels increases in dairy cows fed diets containing 10% whole soybean, 10%

whole soybean plus 2.5% tallow or 10% whole soybean plus 4.0% tallow compared to the animals fed diet without fat source. The higher triglycerides and cholesterol blood levels are expected when fat sources are included in diets, because of the higher demand of these compounds in lipid digestion, absorption, and transport processes (Bauchart, 1993).

Based on the similar animal performance among the U, SMnf and SM treatments the CNCPS method was a better protein supply predictor than *in situ* method, because the MP supply calculated from RDP and RUP values estimated by CNCPS were sufficient to reach the animals requirements, except for the U treatment, however, the MP supply was only slightly lower compared to requirement. All TMR silages provided high RDP supply, regardless of the method used to estimate the protein degradability, which were expected due to protein breakdown during silage fermentation. Although, the RDP values estimated by *in situ* method were higher than those estimated by CNCPS. Limitations of the *in situ* technique are well known (Michalet-Doreau and Ould-Bah, 1992) and one of the major problems is associated to the soluble protein fraction (A), which, according to the Ørskov and McDonald (1979) model, is totally degraded in the rumen. This fraction includes not only the rapidly degraded NPN, but also soluble proteins that are not instantaneously degraded and small undegraded particles that escape of the bag pores. Researches have shown that the breakdown rates of soluble proteins are highly variable (Broderick et al., 1988; Hedqvist and Udén, 2006), thus considerable amounts of soluble proteins can escape of the rumen degradation. Peltekova and Broderick (1996) using an *in vitro* technique estimated that 20% of the soluble protein of alfalfa silage escapes of the rumen. Ahvenjärvi et al. (2018) in study with <sup>15</sup>N labeled reported that 12.5% of soluble N of timothy silage escaped of ruminal degradation in the liquid phase. These findings suggest that the *in*

*situ* method overestimates protein fraction A and consequently the ruminal CP degradability, which can explain the higher RDP supplies estimated by *in situ* method in our study.

An excessive RDP supply from TMR silages is probably inevitable, but based on the animal performance and protein supply results of our study, adequate amounts of MP to meet animal requirements were provided. However, more studies are necessary to define and predict proteolysis patterns for a given ingredient or an ingredients combination, both during ensiling and rumen fermentation, and, ultimately, allows to meet the MP requirements of the animals adequately.

### **CONCLUSION**

The TMR silages showed adequate fermentation pattern, low fermentative loss and high aerobic stability. The supplementation with soybean meal (true protein source) at feeding did not improve the finishing Nellore heifers performance fed TMR silage. If used in finishing diets, the true protein source can be ensiled with other ingredients as TMR silage. The soybean grain inclusion (a protein and lipid source), even in diets with a high proportion of ensiled corn grain, improved the finishing heifers performance.

## REFERENCES

- Ahvenjärvi, S., M. Vaga, A. Vanhatalo, and P. Huhtanen. 2018. Ruminal metabolism of grass silage soluble nitrogen fractions. *J. Dairy Sci.* 101:279-294.  
doi:10.3168/jds.2016-12316.
- Andrae, J. G., S. K. Duckett, C. W. Hunt, G. T. Pritchard, and F. N. Owens. 2001. Effects of feeding high-oil corn to beef steers on carcass characteristics and meat quality. *J. Anim. Sci.* 79:582-588. doi:10.2527/2001.793582x.
- AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15<sup>th</sup> ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.
- Bauchart, D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *J. Dairy Sci.* 76:3864-3881. doi:10.3168/jds.s0022-0302(93)77728-0.
- Belal, S. A., D. R. Kang, S. W. Choi, K. D. Song, J. D. Oh, H. K. Lee, M. J. Lee, C. S. Na, H. S. Choe, and K. S. Shim. 2017. Meat quality, fatty acid composition, blood parameters and nucleotide compounds analysis fed long chain fatty acid calcium salts in Hanwoo steers (Korean native cattle). *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 12:88-95.  
doi:10.3923/ajava.2017.88.95.
- Benton, J. R., T. J. Klopfenstein, and G. E. Erickson. 2005. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Reports*, University of Nebraska, Lincoln. p. 31-33.
- Bevans, D. W., K. A. Beauchemin, K. S. Schwartzkopf-Genswein, J. J. McKinnon, and T. A. McAllister. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Animal Sci.* 83:1116-1132.  
doi:10.2527/2005.8351116x.
- Bindel, D. J., J. S. Drouillard, E. C. Titgemeyer, R. H. Wessels, and C. A. Löest. 2000. Effects of ruminally protected choline and dietary fat on performance and blood



metabolites of finishing heifers. *J. Anim. Sci.* 78:2497-2503.

doi:10.2527/2000.78102497x.

Blanchflower, W. J., and D.G. Kennedy. 1996. Determination of monensin, salinomycin and narasin in muscle, liver and eggs from domestic fowl using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 26:225-33. doi:10.1016/0378-4347(95)00367-3.

Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917. doi:10.1139/o59-099.

Brandt Jr., R. T., and S. J. Anderson. 1990. Supplemental fat sources affects feedlot performance and carcass traits of finishing yearling steers and estimated diet energy value. *J. Anim. Sci.* 68:2208-2216. doi:10.2527/1990.6882208x.

Broderick, G. A., R. J. Wallace, E. R. Orskov, and L. Hansen. 1988. Comparison of estimates of ruminal protein degradation by *in vitro* or *in situ* methods. *J. Anim. Sci.* 66:1739-1745. doi:10.2527/jas1988.6671739x.

Chaney, A. L., and E. P. Marbach. 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 8:130-132. doi:10.1093/clinchem/8.2.130.

Chen, L., G. Guo, C. Yu, J. Zhang, M. Shimojo, and T. Shao. 2015. The effects of replacement of whole-plant corn with oat and common vetch on the fermentation quality, chemical composition and aerobic stability of total mixed ration silage in Tibet. *Anim. Sci. J.* 86:69-76. doi:10.1111/asj.12245.

Choi, B. R., and D. L. Palmquist. 1996. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *J. Nutr.* 126:2913-2919. doi:10.1093/jn/126.11.2913.

- Cushnahan, A., C. S. Mayne, and E. F. Unsworth. 1995. Effects of ensilage of grass on performance and nutrient utilization by dairy cattle. 2. Nutrient metabolism and rumen fermentation. *Anim. Sci.* 60:347-359. doi:10.1017/S1357729800013229.
- Danner, H., M. Holzer, E. Mayrhuber, and R. Braun. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562-567. doi:10.1128/AEM.69.1.562-567.2003.
- Der Bedrosian, M. C., K. E. Nestor Jr., and L. Kung Jr. 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. *J. Dairy Sci.* 95:5115-5126. doi:10.3168/jds.2011-4833.
- DeVries, T. J., and R. M. Gill. 2012. Adding liquid feed to a total mixed ration reduces feed sorting behavior and improves productivity of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:2648-2655. doi:10.3168/jds.2011-4965.
- Ely, L. O. 1978. The use of added feedstuffs in silage production. In: *Fermentation of silage-A review*. National Feed Ingredient Association, West Des Moines, IA. p. 233-280.
- Feussner, I., and C. Wasternack. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annual Review Plant Bio.* 53:275-297. doi:10.1146/annurev.arplant.53.100301.135248.
- Gadge, P. P., S. D. Madhikar, J. N. Yewle, U. U. Jadhav, A. D. Chougale, V. P. Zambare, and M. V. Padul. 2011. Biochemical studies of lipase from germinating oil seeds (*Glycine max*). *American J. Biochem. and Biotechnol.* 7:141-145. doi:10.3844/ajbbsp.2011.141.145.
- Galyean, M. L., K. J. Malcolm-Callis, D. R. Garcia, and G. D. Pulsipher. 1992. Effects of varying the patterns of feed consumption on performance by programmed-fed steers. Clayton Livestock Research Center, New Mexico State University, Progress Report No. 78.

- Gillis, M. H., S. K. Duckett, J. R. Sackmann, C. E. Realini, D. H. Keisler, and T. D. Pringle. 2004. Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or linoleic acid on feedlot performance, carcass quality, and leptin concentrations in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 82:851-859. doi:10.2527/2004.823851x.
- Hall, M. B. 2014. Selection of an empirical detection method for determination of water-soluble carbohydrates in feedstuffs for application in ruminant nutrition. *Anim. Feed Sci. Tech.* 198:28-37. doi:10.1016/j.anifeedsci.2014.08.009.
- Hao, W., H. L. Wang, T. T. Ning, F. Y. Yang, and C. C. Xu. 2015. Aerobic stability and effects of yeasts during deterioration of non-fermented and fermented total mixed ration with different moisture levels. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28:816-826. doi:10.5713/ajas.14.0837.
- Hedqvist, H., and P. Udén. 2006. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:1-21. doi:10.1016/j.anifeedsci.2005.05.011.
- Heron, S. J. E., R. A. Edwards, and P. McDonald. 1986. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. *J. Sci. Food Agri.* 37:979-985. doi:10.1002/jsfa.2740371005.
- Hoffman, P. C., N. M. Esser, R. D. Shaver, W. H. Coblenz, M. P. Scott, A. L. Bodnar, R. J. Schmidt, and R. C. Charley. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94:2465-2474. doi:10.3168/jds.2010-3562.
- Huhtanen, P., H. Khalili, J. I. Nousiainen, M. Rinne, S. Jaakkola, T. Heikkilä, and J. Nousiainen. 2002. Prediction of relative intake potential of grass silage by dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 73:111-130. doi:10.1016/S0301-6226(01)00279-2.
- Hu, X., W. Hao, H. Wang, T. Ning, M. Zheng, and C. Xu. 2015. Fermentation characteristics and lactic acid bacteria succession of total mixed ration silages

- formulated with peach pomace. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 28:502-510.  
doi:10.5713/ajas.14.0508.
- Ireland-Perry, R. L., and C. C. Stallings. 1993. Fecal consistency as related to dietary composition in lactating holstein cows. *J. Dairy Sci.* 76: 1074-1082.  
doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77436-6.
- ISO. 1978. International Organization for Standardization. Animal and vegetable fats and oils - Preparation of methyl esters of fatty acids. Method ISO 5509. Geneva, CH. p.1-6.
- Jonsson, A. 1990. Enumeration and confirmation of *Clostridium tyrobutyricum* in silages using neutral red, d-cycloserine, and lactate dehydrogenase activity. *J. Dairy Sci.* 13:719-725. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78725-5.
- Joseph, J. D., and R. G. Ackman. 1992. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J. AOAC Int.* 75:488-506. doi:10.1093/jaoac/75.3.488.
- Junges, D., G. Morais, M. H. F. Spoto, P. S. Santos, A. T. Adesogan, L. G. Nussio, and J. L. P. Daniel. 2017. Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *J. Dairy Sci.* 100:9048-9051.  
doi:10.3168/jds.2017-12943.
- Kasmaei, K. M., B. O. Rustas, R. Spöndly, and P. Udén. 2013. Prediction models of silage fermentation products on crop composition under strict anaerobic conditions: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96:6644–6649. doi: 10.3168/jds.2013-6858.
- Kemble, A. R. 1956. Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. *J. Sci. Food Agri.* 7:125-130. doi:10.1002/jsfa.2740070206.

- Khorasani, G. R., and J. J. Kennelly. 1998. Effect of added dietary fat on performance, rumen characteristics, and plasma metabolites of midlactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2459-2468. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)70137-7.
- Kondo, M., K. Shimizu, A. Jayanegara, T. Mishima, H. Matsui, S. Karita, M. Goto, and T. Fujihara. 2016. Changes in nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of total mixed ration silage stored at different temperatures and periods. *J. Sci. Food Agric.* 96:1175-1180. doi:10.1002/jsfa.7200.
- Kononoff, P.J., A. J. Heinrichs, and D. R. Buckmaster. 2003. Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. *J. Dairy Sci.* 86:1858-1863. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73773-4.
- Krehbiel, C. R., R. A. McCoy, R. A. Stock, T. J. Klopfenstein, D. H. Shain, and R. P. Huffman. 1995. Influence of grain type, tallow level, and tallow feeding system on feedlot cattle performance. *J. Anim. Sci.* 73:2916-2921. doi:10.2527/1995.73102916x.
- Kung Jr., L., R. D. Shaver, R. J. Grant, and R. J. Schmidt. 2018. Silage review: interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101:4020-4033. doi:10.3168/jds.2017-13909.
- Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantify, quality, and length of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557-564. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0.
- Lessard, J. R., J. D. Erfle, F. D. Sauer, and S. Mahadevan. 1978. Protein and amino acid patterns in maize ensiled with or without urea. *J. Sci. Food Agric.* 29:506-512. doi:10.1002/jsfa.2740290603.

- Licitra, G., T. M. Hernandez, and P. J. Van Soest. 1996. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Tech.* 57:347-358. doi:10.1016/0377-8401(95)00837-3.
- Lin, C., K. K. Bolsen, B. E. Brent, R. A. Hart, J. T. Dickerson, A. M. Feyerherm, and W. R. Aimutis. 1992. Epiphytic microflora on alfalfa and whole-plant corn. *J. Dairy Sci.* 75:2484-2493. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)78010-2.
- Liu, Q., J. Wu, and T. Shao. 2019. Roles of microbes and lipolytic enzymes in changing the fatty acid profile,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene of whole-crop oat silages during ensiling and after exposure to air. *Anim. Feed Sci. Tech.* 253:81-92. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.04.004.
- Maekawa, M., K. A. Beauchemin, and D. A. Christensen. 2002. Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cow. *J. Dairy Sci.* 85:1165-1175. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74179-9.
- Malekian, F., R. M. Rao, W. Prinyawiwatkul, W. E. Marshall, M. Windhauser, and M. Ahmedna. 2000. Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. In: Bulletin number 870, LSU AgCenter, Baton Rouge, LA. p. 1-68.
- Marshall, D. M. 1994. Breed differences and genetic parameters for body composition traits in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 72:2745-2755. doi:10.2527/1994.72102745x.
- McDonald, P., A. R. Henderson, and S. J. E. Heron. 1991. *The Biochemistry of Silage*. 2<sup>nd</sup> rev. ed. Chalcombe Publ., Aberystwyth, UK.
- Mertens, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* 85:1217-1240.

- Michalet-Doreau, B., and M. Y. Ould-Bah. 1992. *In vitro* and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40:57-86. doi:10.1016/0377-8401(92)90112-J.
- Miyaji, M., H. Matsuyama, K. Hosoda, and K. Nonaka. 2013. Milk production, nutrient digestibility and nitrogen balance in lactating cows fed total mixed ration silages containing steam-flaked brown rice as substitute for steam-flaked corn, and wet food by-products. *Anim. Sci. J.* 84:483-488. doi:10.1111/asj.12026.
- Miyaji, M., H. Matsuyama, and K. Nonaka. 2017. Effect of ensiling process of total mixed ration on fermentation profile, nutrient loss and *in situ* ruminal degradation characteristics of diet. *Anim. Sci. J.* 88:134-139. doi:10.1111/asj.12610.
- Miyaji, M., and K. Nonaka. 2018. Effects of altering total mixed ration conservation method when feeding dry-rolled versus steam-flaked hulled rice on lactation and digestion in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:5092-5101. doi:10.3168/jds.2017-13802.
- Muck, R. E. Recent advances in silage microbiology. 2013. *Agric. Food Sci.* 22:3-15. doi:10.23986/afsci.6718.
- NASEM. 2016. National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Nutrient requirements of beef cattle. 8<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ning, T., H. Wang, M. Zheng, D. Niu, S. Zuo, and C. Xu. 2017. Effects of microbial enzymes on starch and hemicellulose degradation in total mixed ration silages. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 30:171-180. doi:10.5713/ajas.16.0046.
- Nishino, N., M. Yoshida, H. Shiota, and E. Sakaguchi. 2003a. Accumulation of 1,2-propanediol and enhancement of aerobic stability in whole crop maize silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *J. Appl. Microbiol.* 94:800-807. doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01810.x.

- Nishino, N., H. Harada, and E. Sakaguchi. 2003b. Evaluation of fermentation and aerobic stability of wet brewers' grains ensiled alone or in combination of various feeds as a total mixed ration. *J. Sci. Food Agric.* 83:557-563. doi:10.1002/jsfa.1395.
- Nishino N., H. Wada, M. Yoshida, H. Shiota. 2004. Microbial counts, fermentation products, and aerobic stability of whole crop corn and a total mixed ration ensiled with and without inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J. Dairy Sci.* 87:2563-2570. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73381-0.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7<sup>th</sup> ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- O'Kiely, P. 1993. Influence of a partially neutralised blend of aliphatic organic acids on fermentation, effluent production and aerobic stability of autumn-grass silage. *Ir. J. Agric. Food Res.* 32:13-26.
- Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92:499-503. doi:10.1017/S0021859600063048.
- Pahlow G., R. E. Muck, F. Driehuis, S. J. W. H Oude Elferink, and S. F. Spoelstre. 2003. Microbiology of ensiling. In: D. R. Buxton, R. E. Muck, and J. H. Harrison, editors, *Silage science and technology*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Society of America; Madison, WI. p.31-93.
- Peltekova, V. D., and G. A. Broderick. 1996. *In vitro* ruminal degradation and synthesis of protein on fractions extracted from alfalfa hay and silage. *J. Dairy Sci.* 79:612-619. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76406-8.



- Pryce, J. D. 1969. A modification of Barker-Summerson method for the determination of lactic acid. *Analyst*. 94:1151-1152. doi: 10.1039/an9699401151.
- Ramirez, J. E., and R. A. Zinn. 2000. Interaction of dietary magnesium level on the feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 78:2072-2080. doi:10.2527/2000.7882072x.
- Restelatto, R., C. O. Novinski, L. M. Pereira, E. P. A. Silva, D. Volpi, M. Zopollatto, P. Schmidt, and A. P. Faciola. 2019. Chemical composition, fermentative losses, and microbial counts of total mixed ration silages inoculated with different *Lactobacillus* species. *J. Anim. Sci.* 97:1634-1644. doi:10.1093/jas/skz030.
- Rook, A. J., and M. Gill. 1990. Prediction of the voluntary intake of grass silages by beef cattle. 1. Linear regression analyses. *Anim. Prod.* 50:425-438. doi:10.1017/s0003356100004918.
- Rooke, J. A. 1990. The numbers of epiphytic bacteria on grass at ensilage on commercial farms. *J. Sci. Food Agr.* 51:525-533. doi:10.1002/jsfa.2740510409.
- Schauff, D. J., J. P. Elliot, J. H. Clark, and J. K. Drackley. 1992. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing whole soybeans and tallow. *J. Dairy Sci.* 75:1923-1935. doi:10.3168/jds.s0022-0302(92)77952-1.
- Schingoethe, D. J. 2017. A 100-Year Review: Total mixed ration feeding of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100:10143-10150. doi:10.3168/jds.2017-12967.
- Senger, T., T. Wichard, S. Kunze, C. Göbel, J. Lerchl, G. Pohnert, and I. Feussner. 2005. A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biological Chem.*, 280:7588-7596. doi:10.1074/jbc.M411738200.
- Soto-Navarro, S. A., G. C. Duff, C. R. Krehbiel, M. L. Galyean, and K. J. Malcolm-Callis. 2000. Influence of feed intake fluctuation, feeding frequency, time of

- feeding and rate of gain on performance by limit-fed steers. *Prof. Anim. Sci.* 16:13-20. doi:10.15232/S1080-7446(15)31655-7.
- Tylutki, T. P., D. G. Fox, V. M. Durbal, L. O. Tedeschi, J. B. Russell, M. E. Van Amburgh, T. R. Overton, L. E. Chase, and A. N. Pell. 2008. Cornell Net Carbohydrate and Protein System: A model for precision feeding of dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 143:174-202. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.05.010.
- Van Amburgh, M. E., E. A. Colleo-Saenz, R. J. Higgs, D. A. Ross, E. B. Recktenwald, E. Raffrenato, L. E. Chase, T. R. Overton, J.K. Mills, and A. Foskolos. 2015. The Cornell Net Carbohydrate System: Updates to the model and evaluation of version 6.5. *J. Dairy Sci.* 98:6361-6380. doi:10.3168/jds.2015-9378.
- Van Os, M., J. P. Dulphy, and R. Baumont. 1995. The effect of protein degradation products in grass silages on feed intake and intake behaviour in sheep. *Br. J. Nutr.* 73:51-64. doi:10.1079/bjn19950008.
- Van Soest, P. J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.* 26:119-128. doi:10.2527/jas1967.261119x.
- Visentainer, J. V. 2012. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. *Quim. Nova.* 35:274-279. doi:10.1590/S0100-40422012000200008.
- Wang, F., and N. Nishino. 2008. Resistance to aerobic stability, of total mixed ration silage: effect of ration formulation, air infiltration and storage period on fermentation characteristics and aerobic stability. *J. Sci. Food Agr.* 88:133-140. doi:10.1002/jsfa.3057.
- Wang, F., and N. Nishino. 2013. Effects of storage temperature and ensiling period on fermentation products, aerobic stability and microbial communities of total mixed ration silage. *J. Appl. Microbiol.* 114:1687-1695. doi:10.1111/jam.12200.

- Weinberg, Z. G., Y. Chen, D. Miron, Y. Raviv, E. Nahim, A. Bloch, E. Yosef, M. Nikbahat, and J. Miron. 2011. Preservation of total mixed rations for dairy cows in bales wrapped with polyethylene stretch film - A commercial scale experiment. *Anim. Feed Sci. Tech.* 164:125-129. doi:10.1016/j.anifeedsci.2010.11.016.
- Weissbach, F. 1967. The determination of buffering capacity of forage plants for the assessment of their ensilability. *Acad. Agric. Sci. Berlin, DE.* 92:211-220.
- Weissbach, F., L. Schmidt, and E. Hein. 1974. Method of anticipation of the run of fermentation in silage making based on the chemical composition of the green fodder. *Proc. XII International Grassland Congress, Moscow, RU.* 3:663-673.
- Wheeler, W. E., and C. H. Noller. 1977. Gastrointestinal tract pH and starch in feces of ruminants. *J. Anim. Sci.* 44:131-135. doi:10.2527/jas1977.441131x.
- Wilkins, R. J., K. J. Hutchinson, R. F. Wilson, and C. E. Harris. 1971. The voluntary intake of silage by sheep: I. Interrelationships between silage composition and intake. *J. Agric. Sci.* 77:531-537. doi:10.1017/S0021859600064613.
- Zinn, R. A. 1988. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. *J. Anim. Sci.* 66:213-227. doi:10.2527/jas1988.661213x.
- Zinn, R. A. 1989. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for feedlot steers: feedlot cattle growth and performance. *J. Anim. Sci.* 67:1029-1037. doi: 10.2527/jas1989.6741029x.
- Zinn, R. A. 1992. Comparative feeding value of supplemental fat in steam-flaked corn- and steam-flaked wheat-based finishing diets for feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 70:2959-2969. doi:10.2527/1992.70102959x.

- Zinn, R. A. 1994. Influence of fluctuating feed intake on feedlot cattle growth-performance and digestive function. Proc. Southwest Nutrition Management Conference, University of Arizona, Tucson. p. 77-83.
- Zinn, R. A., and Y. Shen. 1996. Interaction of dietary calcium and supplemental fat on digestive function and growth performance in feedlot steers. *J. Anim. Sci.* 74:2303-2309. doi:10.2527/1996.74102303x.
- Zinn, R. A., and Y. Shen. 1998. An evaluation of ruminally degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves. *J. Anim. Sci.* 76:1280-1289. doi:10.2527/1998.765128.

## TABLES

**Table 1.** Composition of total mixed rations

| Item                             | Treatment <sup>1</sup> |      |      |      |
|----------------------------------|------------------------|------|------|------|
|                                  | U                      | SMnf | SM   | SG   |
| Ingredients, % DM                |                        |      |      |      |
| Sugarcane bagasse                | 13.0                   | 13.0 | 13.0 | 13.0 |
| Corn gluten feed                 | 15.0                   | 15.0 | 15.0 | 15.0 |
| Dry rolled corn                  | 68.4                   | 62.3 | 62.3 | 59.4 |
| Urea                             | 1.0                    |      |      |      |
| Soybean meal – non ensiled       |                        | 7.1  |      |      |
| Soybean meal                     |                        |      | 7.1  |      |
| Rolled soybean grain             |                        |      |      | 10.0 |
| Vitamin-mineral mix <sup>2</sup> | 2.0                    | 2.0  | 2.0  | 2.0  |
| Limestone                        | 0.6                    | 0.6  | 0.6  | 0.6  |

<sup>1</sup>U: TMR with urea; SMnf: TMR with soybean meal supplemented at feeding; SM: TMR with soybean meal; SG: TMR with rolled soybean grain.

<sup>2</sup>Composition per kg: 160 g Ca, 64 mg Co, 800 mg Cu, 300 mg F, 48 mg I, 800 mg Mn, 24 g Mg, 110 g Na, 30 g P, 22 g S, 12 mg Se, 2400 mg Zn and 1500 mg of monensin sodium.

**Table 2.** Characteristics of the fresh and ensiled total mixed rations

| Item                                    | Treatment <sup>1</sup> |       |       |       | SEM    | P-contrast |             |           |
|---|------------------------|-------|-------|-------|--------|------------|-------------|-----------|
|   | U                      | SMnf  | SM    | SG    |        | U vs. SMnf | SMnf vs. SM | SM vs. SG |
| Fresh TMR                               |                        |       |       |       |        |            |             |           |
| DM <sup>2</sup> , % as fed              | 59.7                   | 60.0  | 60.1  | 60.3  | 0.27   | 0.48       | 0.85        | 0.63      |
| pH                                      | 5.24                   | 5.13  | 5.25  | 6.24  | 0.033  | 0.03       | 0.02        | <0.01     |
| Soluble CP, % CP                        | 51.1                   | 36.5  | 34.3  | 35.6  | 0.66   | <0.01      | 0.04        | 0.24      |
| Soluble carbohydrates, % DM             | 1.42                   | 1.31  | 1.53  | 2.07  | 0.089  | 0.41       | 0.09        | <0.01     |
| Buffering capacity, g lactic acid/kg DM | 23.1                   | 18.0  | 22.8  | 21.0  | 0.40   | <0.01      | <0.01       | <0.01     |
| Fermentability coefficient <sup>3</sup> | 60.5                   | 60.7  | 60.7  | 61.3  | 0.25   | 0.59       | 0.93        | 0.14      |
| Lactic acid bacteria, log cfu/g as fed  | 4.07                   | 3.96  | 4.12  | 4.16  | 0.091  | 0.39       | 0.25        | 0.76      |
| Yeasts, log cfu/g as fed                | 3.81                   | 3.76  | 3.77  | 3.66  | 0.050  | 0.53       | 0.93        | 0.16      |
| Molds, log cfu/g as fed                 | 3.95                   | 3.86  | 4.00  | 3.98  | 0.116  | 0.57       | 0.40        | 0.87      |
| Ensiled TMR                             |                        |       |       |       |        |            |             |           |
| DM, % as fed                            | 60.6                   | 61.9  | 60.7  | 61.6  | 0.53   | 0.11       | 0.14        | 0.23      |
| Soluble CP, % CP                        | 71.3                   | 61.8  | 61.0  | 61.4  | 0.56   | <0.01      | 0.33        | 0.61      |
| NH <sub>3</sub> -N, % total N           | 26.7                   | 8.57  | 8.38  | 9.37  | 0.81   | <0.01      | 0.87        | 0.38      |
| pH                                      | 4.72                   | 4.24  | 4.23  | 4.22  | 0.060  | <0.01      | 0.99        | 0.83      |
| Lactic acid, % DM                       | 3.70                   | 2.45  | 2.36  | 2.67  | 0.413  | 0.09       | 0.90        | 0.69      |
| Acetic acid, % DM                       | 1.29                   | 1.03  | 1.07  | 1.17  | 0.159  | 0.27       | 0.87        | 0.67      |
| Ethanol, % DM                           | 0.550                  | 0.710 | 0.742 | 0.410 | 0.0756 | 0.14       | 0.77        | <0.01     |
| 1,2-Propanediol, % DM                   | 0.040                  | 0.183 | 0.113 | 0.183 | 0.0200 | <0.01      | 0.02        | 0.02      |
| 2,3-Butanediol, % DM                    | 0.110                  | 0.060 | 0.070 | 0.090 | 0.0230 | 0.16       | 0.84        | 0.54      |
| Lactic acid bacteria, log cfu/g as fed  | 5.59                   | 4.47  | 4.55  | 4.65  | 0.574  | 0.21       | 0.92        | 0.91      |
| Yeasts, log cfu/g as fed                | 3.37                   | 3.24  | 3.50  | 3.43  | 0.200  | 0.65       | 0.38        | 0.80      |
| Molds, log cfu/g as fed                 | <2.00                  | <2.00 | <2.00 | <2.00 | -      | -          | -           | -         |
| Clostridia, log cfu/g as fed            | 3.77                   | 2.45  | 3.07  | 3.19  | 0.363  | 0.03       | 0.26        | 0.82      |
| Aerobic spores, log cfu/g as fed        | 3.97                   | 3.62  | 3.66  | 3.61  | 0.262  | 0.36       | 0.91        | 0.87      |
| DM loss, %                              | 3.96                   | 3.63  | 3.56  | 3.58  | 0.138  | 0.12       | 0.75        | 0.95      |
| Aerobic stability, h                    | >240                   | >240  | >240  | >240  | -      | -          | -           | -         |

<sup>1</sup>U: TMR with urea; SMnf: TMR without a protein supplement at ensiling; SM: TMR with soybean meal; SG: TMR with rolled soybean grain.

<sup>2</sup>Dry matter content adjusted by addition of water.

<sup>3</sup>FC = DM (% as fed) + Soluble carbohydrates (g/kg) / Buffering capacity (g/kg).

**Table 3.** Fatty acid profile and monensin concentration in fresh and ensiled total mixed rations

| Item                             | Treatment <sup>1</sup> |      |      |      | SEM   | P-contrast    |                |              |
|----------------------------------|------------------------|------|------|------|-------|---------------|----------------|--------------|
|                                  | U                      | SMnf | SM   | SG   |       | U vs.<br>SMnf | SMnf vs.<br>SM | SM vs.<br>SG |
| Fresh TMR                        |                        |      |      |      |       |               |                |              |
| Monensin, mg/kg DM               | 33.6                   | 35.4 | 32.9 | 33.3 | 1.34  | 0.37          | 0.23           | 0.86         |
| Fatty acids, % total fatty acids |                        |      |      |      |       |               |                |              |
| C16:0                            | 18.9                   | 18.4 | 18.9 | 18.0 | 0.36  | 0.41          | 0.43           | 0.13         |
| C18:0                            | 5.21                   | 5.40 | 4.71 | 5.01 | 0.242 | 0.59          | 0.08           | 0.40         |
| C18:1 trans-9                    | 2.29                   | 2.30 | 1.76 | 1.74 | 0.283 | 0.98          | 0.21           | 0.97         |
| C18:1 cis-9                      | 25.7                   | 25.8 | 25.3 | 23.7 | 0.17  | 0.66          | 0.09           | <0.01        |
| C18:2 cis-9,12                   | 45.7                   | 45.8 | 46.6 | 46.8 | 0.67  | 0.93          | 0.41           | 0.83         |
| C18:3 cis-9,12,15                | 1.07                   | 1.10 | 1.42 | 3.40 | 0.050 | 0.71          | <0.01          | <0.01        |
| Other fatty acids                | 1.16                   | 1.19 | 1.32 | 1.36 | 0.046 | 0.65          | 0.08           | 0.55         |
| Ensiled TMR                      |                        |      |      |      |       |               |                |              |
| Monensin, mg/kg DM               | 31.5                   | 33.1 | 30.8 | 31.1 | 1.25  | 0.73          | 0.23           | 0.29         |
| Fatty acids, % total fatty acids |                        |      |      |      |       |               |                |              |
| C16:0                            | 18.4                   | 18.5 | 18.6 | 18.1 | 0.19  | 0.40          | 0.65           | 0.15         |
| C18:0                            | 4.33                   | 4.42 | 4.35 | 5.02 | 0.231 | 0.97          | 0.83           | 0.11         |
| C18:1 trans-9                    | 1.84                   | 1.48 | 1.42 | 1.69 | 0.235 | 0.24          | 0.86           | 0.54         |
| C18:1 cis-9                      | 26.7                   | 25.3 | 24.4 | 23.8 | 0.24  | <0.01         | 0.02           | <0.01        |
| C18:2 cis-9,12                   | 46.3                   | 48.1 | 48.5 | 46.9 | 0.53  | 0.02          | 0.63           | 0.15         |
| C18:3 cis-9,12,15                | 1.24                   | 1.29 | 1.59 | 3.61 | 0.127 | 0.09          | 0.13           | <0.01        |
| Other fatty acids                | 1.17                   | 0.91 | 1.19 | 0.86 | 0.120 | 0.89          | 0.14           | 0.76         |

<sup>1</sup>U: TMR with urea; SMnf: TMR without soybean meal; SM: TMR with soybean meal; SG: TMR with rolled soybean grain.

**Table 4.** Chemical composition of offered total mixed ration silages (mean  $\pm$  SD)

| Item                               | Treatment <sup>1</sup> |                 |                 |                 |
|------------------------------------|------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                                    | U                      | SMnf            | SM              | SG              |
| DM, % as fed                       | 60.6 $\pm$ 1.26        | 63.5 $\pm$ 1.75 | 60.7 $\pm$ 0.97 | 61.6 $\pm$ 1.36 |
| Crude protein                      | 13.2 $\pm$ 0.42        | 13.5 $\pm$ 0.49 | 13.8 $\pm$ 0.25 | 13.5 $\pm$ 0.19 |
| N fractionation <sup>2</sup> , % N |                        |                 |                 |                 |
| A1                                 | 26.7 $\pm$ 2.70        | 6.02 $\pm$ 0.57 | 8.37 $\pm$ 1.86 | 9.02 $\pm$ 1.41 |
| A2                                 | 44.6 $\pm$ 3.02        | 41.3 $\pm$ 0.65 | 52.6 $\pm$ 1.78 | 52.4 $\pm$ 1.71 |
| B1                                 | 22.2 $\pm$ 0.96        | 40.7 $\pm$ 0.96 | 31.7 $\pm$ 0.59 | 31.3 $\pm$ 0.65 |
| B2                                 | 2.25 $\pm$ 0.27        | 6.35 $\pm$ 0.58 | 1.59 $\pm$ 0.58 | 1.81 $\pm$ 0.50 |
| C                                  | 4.28 $\pm$ 0.35        | 5.60 $\pm$ 0.64 | 5.76 $\pm$ 0.73 | 5.49 $\pm$ 0.46 |
| Neutral detergent fiber            | 29.1 $\pm$ 2.77        | 29.7 $\pm$ 2.57 | 29.7 $\pm$ 2.31 | 30.8 $\pm$ 4.26 |
| Acid detergent fiber               | 14.1 $\pm$ 2.00        | 14.4 $\pm$ 1.59 | 13.8 $\pm$ 2.04 | 15.6 $\pm$ 2.87 |
| Ether extract                      | 3.72 $\pm$ 0.29        | 3.67 $\pm$ 0.24 | 3.54 $\pm$ 0.12 | 5.04 $\pm$ 0.15 |
| Non-fiber carbohydrates            | 50.6 $\pm$ 2.46        | 48.2 $\pm$ 2.32 | 49.1 $\pm$ 2.21 | 46.0 $\pm$ 4.29 |
| Soluble carbohydrates              | 1.19 $\pm$ 0.21        | 1.72 $\pm$ 0.08 | 1.34 $\pm$ 0.21 | 1.80 $\pm$ 0.10 |
| Ash                                | 4.54 $\pm$ 0.22        | 4.99 $\pm$ 0.30 | 4.81 $\pm$ 0.23 | 4.72 $\pm$ 0.13 |

<sup>1</sup>U: ensiled TMR with urea; SMnf: ensiled TMR without soybean meal, but supplemented at feeding; SM: ensiled TMR with soybean meal; SG: ensiled TMR with rolled soybean grain.

<sup>2</sup>Nitrogen fractionation according to CNCPS (Higgs et al., 2015).



**Table 5.** Performance and carcass traits of feedlot Nellore heifers fed total mixed ration silages and calculations of net energy and TDN of total mixed ration silages

| Item  | Treatment <sup>1</sup> |       |       |       | SEM    | P-contrast |             |           |
|---|------------------------|-------|-------|-------|--------|------------|-------------|-----------|
|   | U                      | SMnf  | SM    | SG    |        | U vs. SMnf | SMnf vs. SM | SM vs. SG |
| Initial BW, kg  | 318                    | 313   | 311   | 311   | 8.8    | 0.70       | 0.90        | 0.99      |
| Final BW, kg  | 389                    | 389   | 390   | 407   | 4.8    | 0.90       | 0.91        | 0.02      |
| DMI, kg/d   | 7.91                   | 8.18  | 8.02  | 9.43  | 0.449  | 0.67       | 0.79        | 0.03      |
| Daily DMI variation, %  | 6.64                   | 5.30  | 5.96  | 5.96  | 0.496  | 0.08       | 0.36        | 0.99      |
| ADG, kg/d   | 1.20                   | 1.23  | 1.23  | 1.49  | 0.075  | 0.81       | 0.97        | 0.02      |
| G:F   | 0.153                  | 0.150 | 0.154 | 0.160 | 0.0074 | 0.80       | 0.68        | 0.56      |
| Dressing, %   | 53.9                   | 54.8  | 54.7  | 54.1  | 0.45   | 0.17       | 0.89        | 0.29      |
| Hot carcass weight, kg  | 209                    | 214   | 213   | 220   | 2.3    | 0.12       | 0.69        | 0.05      |
| Back fat thickness, mm  | 4.56                   | 5.95  | 5.03  | 6.20  | 0.565  | 0.11       | 0.26        | 0.14      |
| <i>Biceps femoris</i> fat thickness, mm                                 | 6.56                   | 7.82  | 7.65  | 9.34  | 0.469  | 0.09       | 0.80        | 0.01      |
| Marbling score at 12 <sup>th</sup> -rib (0-10)                          | 3.35                   | 3.53  | 3.56  | 3.63  | 0.132  | 0.35       | 0.91        | 0.67      |
| <i>Longissimus</i> muscle area at 12 <sup>th</sup> rib, cm <sup>2</sup> | 59.0                   | 59.6  | 62.2  | 65.5  | 1.99   | 0.82       | 0.37        | 0.23      |
| Diet energy <sup>2</sup>  |                        |       |       |       |        |            |             |           |
| NE <sub>m</sub> <sup>3</sup> , Mcal/kg DM                               | 1.97                   | 1.92  | 1.96  | 1.96  | 0.076  | 0.64       | 0.70        | 0.99      |
| NE <sub>g</sub> <sup>4</sup> , Mcal/kg DM                               | 1.32                   | 1.27  | 1.31  | 1.30  | 0.067  | 0.62       | 0.68        | 0.98      |
| TDN <sup>5</sup> , % DM   | 81.1                   | 79.4  | 80.8  | 80.7  | 2.39   | 0.64       | 0.69        | 0.98      |

<sup>1</sup>U: ensiled TMR with urea; SMnf: ensiled TMR without soybean meal, but supplemented at feeding; SM: ensiled TMR with soybean meal; SG: ensiled TMR with rolled soybean grain.

<sup>2</sup> Calculated from animal performance data.

<sup>3</sup> Net energy for maintenance.

<sup>4</sup> Net energy for gain.

<sup>5</sup> Total digestible nutrients calculated from animal performance data.

**Table 6.** Feeding behavior, fecal characteristics and blood parameters of feedlot Nellore heifers fed total mixed ration silages

| Item                             | Treatment <sup>1</sup> |       |       |       |        | P-contrast |             |           |
|----------------------------------|------------------------|-------|-------|-------|--------|------------|-------------|-----------|
|                                  | U                      | SMnf  | SM    | SG    | SEM    | U vs. SMnf | SMnf vs. SM | SM vs. SG |
| Eating, min/d                    | 222                    | 189   | 186   | 209   | 33.6   | 0.52       | 0.94        | 0.62      |
| Ruminating, min/d                | 275                    | 249   | 253   | 303   | 26.6   | 0.52       | 0.93        | 0.17      |
| Chewing, min/d                   | 497                    | 439   | 439   | 512   | 39.0   | 0.32       | 0.99        | 0.18      |
| Meals, /d                        | 9.8                    | 9.0   | 9.0   | 10.6  | 0.58   | 0.41       | 0.97        | 0.04      |
| Meal size, kg DM/meal            | 0.808                  | 0.942 | 0.906 | 0.875 | 0.0618 | 0.16       | 0.69        | 0.71      |
| Meal length, min/meal            | 22.2                   | 20.4  | 20.2  | 20.2  | 3.02   | 0.68       | 0.97        | 0.99      |
| Intake rate, g DM/min            | 46.4                   | 57.8  | 47.8  | 45.0  | 7.75   | 0.33       | 0.38        | 0.79      |
| Particle sorting index, % as fed |                        |       |       |       |        |            |             |           |
| 8-19 mm                          | 106                    | 105   | 105   | 105   | 0.5    | 0.14       | 0.55        | 0.49      |
| 1.18-8 mm                        | 101                    | 100   | 100   | 100   | 0.2    | 0.38       | 0.61        | 0.90      |
| Pan                              | 96.6                   | 97.3  | 96.6  | 96.6  | 0.50   | 0.34       | 0.32        | 0.99      |
| Fecal score (1-4)                | 2.94                   | 2.91  | 2.86  | 2.96  | 0.059  | 0.78       | 0.55        | 0.26      |
| Fecal DM                         | 23.5                   | 23.9  | 24.2  | 23.7  | 0.50   | 0.58       | 0.69        | 0.43      |
| Fecal pH                         | 6.34                   | 6.27  | 6.27  | 6.07  | 0.077  | 0.53       | 0.95        | 0.08      |
| Glucose, mg/dL                   | 62.6                   | 63.9  | 65.7  | 62.3  | 3.26   | 0.78       | 0.71        | 0.46      |
| Urea, mg/dL                      | 37.4                   | 38.6  | 38.7  | 36.9  | 1.61   | 0.61       | 0.99        | 0.43      |
| Total protein, g/dL              | 7.05                   | 7.60  | 7.18  | 7.31  | 0.127  | <0.01      | 0.03        | 0.48      |
| Triglycerides, mg/dL             | 17.6                   | 20.2  | 20.0  | 25.1  | 1.87   | 0.35       | 0.93        | 0.05      |
| Cholesterol, mg/dL               | 172                    | 183   | 193   | 256   | 13.0   | 0.59       | 0.58        | <0.01     |

<sup>1</sup>U: ensiled TMR with urea; SMnf: ensiled TMR without soybean meal, but supplemented at feeding; SM: ensiled TMR with soybean meal; SG: ensiled TMR with rolled soybean grain.

**Table 7.** Calculations of protein supply in Nellore heifers fed total mixed ration silages

| Item                                   | Treatment <sup>1</sup> |       |       |       |         |       |       |       |
|--|------------------------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
|  | U                      | SMnf  | SM    | SG    | U       | SMnf  | SM    | SG    |
|  | CNCPS                  |       |       |       | in situ |       |       |       |
| Requirement of MP for maintenance, g/d | 308                    | 309   | 309   | 314   | 308     | 309   | 309   | 314   |
| Requirement of MP for gain, g/d        | 280                    | 297   | 292   | 331   | 280     | 297   | 292   | 331   |
| Total MP requirement, g/d              | 588                    | 605   | 601   | 645   | 588     | 605   | 601   | 645   |
| Microbial CP, g/d                      | 606                    | 612   | 614   | 681   | 606     | 612   | 614   | 681   |
| Microbial MP, g/d                      | 388                    | 392   | 393   | 436   | 388     | 392   | 393   | 436   |
| RDP supply, g/d                        | 808                    | 791   | 808   | 930   | 921     | 806   | 936   | 1059  |
| RDP balance, g/d                       | +202                   | +179  | +194  | +249  | +315    | +194  | +322  | +378  |
| RDP balance, %                         | +33.4                  | +29.2 | +31.6 | +36.5 | +52.0   | +31.6 | +52.5 | +55.5 |
| RUP supply, g/d                        | 236                    | 314   | 299   | 343   | 123     | 299   | 170   | 214   |
| MP from RUP, g/d                       | 183                    | 243   | 231   | 266   | 95      | 231   | 132   | 165   |
| Total MP supply, g/d                   | 570                    | 634   | 624   | 702   | 483     | 623   | 525   | 601   |
| Total MP balance, g/d                  | -17                    | +29   | +23   | +56   | -105    | +18   | -76   | -44   |
| Total MP balance, %                    | -3.0                   | +4.8  | +3.9  | +8.7  | -17.8   | +2.9  | -12.6 | -6.8  |

<sup>1</sup>U: ensiled TMR with urea; SMnf: ensiled TMR without soybean meal, but supplemented at feeding; SM: ensiled TMR with soybean meal; SG: ensiled TMR with rolled soybean grain.

Requirements of microbial CP and MP for maintenance and gain calculated according to the NASEM, (2016).

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ensilagem de RTM não é uma prática recente, porém no Brasil poucos estudos têm avaliado o processo de conservação de silagens de RTM, além de seus efeitos sobre o desempenho de bovinos em terminação. Vários estudos com silagens de ração total misturada em países asiáticos, como o Japão, onde a ensilagem de ração completa é utilizada a mais de 30 anos, têm mostrado eficiência na conservação de subprodutos úmidos quando estes são utilizados como ingredientes de silagens de RTM. No Brasil, devido à grande disponibilidade de subprodutos gerados pela agroindústria o interesse das mesmas na produção e comercialização de silagens de RTM vêm crescendo, assim como o interesse dos produtores na adoção desta prática.

Comparada a RTM convencional preparada diariamente, a ensilagem da RTM requer menos mão-de-obra. A necessidade da compra de insumos em grandes quantidades de uma só vez para o preparo da ração pode ser contornada com planejamento e escalonamento e assim o produtor pode aproveitar para adquirir os ingredientes em épocas de preços mais baixos. Alternativamente à compra de equipamentos para a produção dentro da propriedade, os produtores podem lançar mão da terceirização da produção, quando este tipo de serviço está disponível em sua região.

O bom padrão de fermentação de silagens de RTM, além da alta estabilidade aeróbia são pontos positivos comuns reportados em vários trabalhos e foram também demonstrados neste estudo. A ensilagem, porém, causa alterações nutricionais, principalmente influenciando na disponibilidade dos nutrientes, o que pode influenciar no desempenho dos animais. Esse estudo demonstrou alterações significativas das frações proteicas das dietas devido à proteólise que ocorre durante o processo fermentativo, contudo, as dietas preparadas foram capazes de atender as exigências dos animais, exceto aquela preparada com ureia. A inclusão de ureia como ingrediente de silagens de RTM destinadas à bovinos de corte pode ser feita, porém, com base na literatura e indícios observados neste experimento, níveis de inclusão ao redor de 0,5% (base de MS) podem ser mais apropriados, sendo o restante do conteúdo proteico da dieta complementado com outras fontes de proteína verdadeira.

Quando o grão de soja for comparado ao farelo de soja em termos financeiros, além do custo por kg de MS de ração, deve-se considerar também a maior velocidade de ganho dos animais alimentados com a dieta contendo grão de soja, o que proporciona giro mais

rápido no confinamento e diluição de custos não associados aos ingredientes da dieta (“custos fixos”).

Em resumo, este estudo demonstrou potencial de utilização de RTM ensilada para bovinos de corte, porém, mais estudos são necessários para predição de padrões de proteólise considerando os diversos ingredientes que podem ser utilizados na formulação das RTM, a fim de se atender as exigências dos animais e não comprometer o desempenho.