

## Intake and *in vivo* digestibility of *Tetrachne dregei* differed from autumn supplemented with a ruminal protein activator

### Consumo y digestibilidad *in vivo* de *Tetrachne dregei* diferido de otoño suplementado con un activador proteico ruminal

G. N. D'Ascanio<sup>1</sup>, A. Elías<sup>2</sup>, C. Frasinelli<sup>3</sup>, R. Rodríguez<sup>2</sup> and F. Herrera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>NUTREZA SRL, Ruta 11, km 751. (3572) Malabrigo, Santa Fe, Argentina

<sup>2</sup>Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>3</sup>INTA EEA, San Luis, Argentina

Email: [www.nutreza.com.ar](http://www.nutreza.com.ar)

In order to evaluate the animal response of a ruminal protein activator in animals which intake a *Tetrachne dregei* summer grass, differed from autumn and ripe, with the purpose of improving the forages intake and the *in vivo* dry matter digestibility, two doses of a ruminal protein activator (200 and 400 g. head.d<sup>-1</sup>) and a control without the activator in 280 kg steers were studied in a metabolism shed. These animals received *Tetrachne dregei* controlled in a completely randomized design with three treatments, three repetitions and four sampling days for food intake and feces collection measurements. The average composition was of 5.7 and 40.6 % of crude protein, 73.1 and 32.5 % of neutral detergent fiber, for *Tetrachne dregei* and the ruminal protein activator, respectively. It was estimated 77.52 % of degradable protein in the activator. The control animals, only fed with *Tetrachne dregei* had lower total dry matter intake, forage dry matter intake and dry matter digestibility with respect to the treated groups (P < 0.001), without significant differences. The total dry matter intake, dry matter digestibility and the digestible dry matter intake, was increased in 18.9, 9.3 and 33.6 % respectively, compared to that obtained in the treated animals, (P < 0.001) and the forage dry matter intake in 14.5 % (P < 0.002), but there were not significant differences between doses. The ruminal protein activator achieved high response to low doses, when increasing the intake of digestible organic matter and degradable protein significantly in 34 and 50 %, respectively (P < 0.001).

Key words: *protein supplementation, forages, low quality, protein activator*

#### Introduction

In the central semiarid region of Argentina, meat production systems include, among other management factors, the perennial summer grasses intake in the forage chain which increase the stocking rate capacity, resulting in production increase, lower costs and productive stability. This region has an average annual precipitations regime between 200 to 600 mm, which include La Pampa and San Luis provinces and the Mendoza center-east, with estimated total area of 260.000 km<sup>2</sup> (Chiossone 2011). The potential production of this environment is, as average, 1200 kg DM/ha year, which mean supporting an stocking rate of 0.2 a/ha (Sala *et al.* 1988).

These types of the described grasslands have in common two important characteristics: their low

Para evaluar la respuesta de un activador proteico ruminal en animales que consumen una gramínea estival *Tetrachne dregei*, madura y diferida de otoño, con el propósito de mejorar el consumo de forrajes y la digestibilidad de la materia seca *in vivo*, se estudiaron en un galpón de metabolismo dos dosis de un activador proteico ruminal (200 y 400 g.cabeza.d<sup>-1</sup>) y un control sin el activador en novillos de 280 kg. Estos animales recibieron de manera controlada *Tetrachne dregei* en un diseño completamente aleatorizado con tres tratamientos, tres repeticiones y cuatro días de muestreo para las mediciones consumo de alimento y recolección de heces. La composición promedio fue de 5.7 y 40.6 % de proteína bruta, 73.1 y 32.5 % de fibra neutro detergente, para *Tetrachne dregei* y el activador proteico ruminal, respectivamente. Se estimó en el activador 77.52 % de proteína degradable. Los animales control, alimentados solo con *Tetrachne dregei* tuvieron menor consumo de materia seca total, consumo de materia seca de forraje y digestibilidad de materia seca con respecto a los grupos tratados (P < 0.001), sin diferencias significativas. El consumo de materia seca total, la digestibilidad de la materia seca y el consumo de materia seca digestible, se incrementó en 18.9, 9.3 y 33.6 % respectivamente, en comparación con lo obtenido en los animales tratados, (P < 0.001) y el consumo de materia seca de forraje en 14.5 % (P < 0.002), pero no hubo diferencias significativas entre dosis. EL activador proteico ruminal logró alta respuesta a bajas dosis, al incrementar de manera significativa el consumo de materia orgánica digestible y de proteína degradable en 34 y 50 %, respectivamente (P < 0.001).

Palabras clave: *suplementación proteica, forrajes, baja calidad, activador proteico*

#### Introducción

En la región semiárida central de Argentina, los sistemas de producción de carne incluyen, entre otros factores de manejo, la utilización de gramíneas estivales perennes en la cadena forrajera que incrementan la capacidad de carga, con el consiguiente aumento de la producción, disminución de costos y estabilidad productiva. Esta región tiene un régimen pluviométrico anual promedio entre 200 a 600 mm, que incluye las provincias de La Pampa y San Luis y el centro-este de Mendoza, con superficie total estimada de 260.000 km<sup>2</sup> (Chiossone 2011). La producción potencial de este ambiente es, como promedio, de 1200 kg de MS/ha año, lo que significaría soportar una carga de 0.2 a/ha (Sala *et al.* 1988).

Estos tipos de pastizales descritos tienen en común dos características importantes: su baja concentración

protein concentration during most of the year and their high fiber content. Therefore, any purpose to improve forage production, their quality or use, would result in a significant economic benefit.

The poor contribution of nutrients necessary for the ruminal microorganisms growth results on the microbial biomass decrease, reduction of the digestibility and the animal total intake, particularly in fibrous forages (Elías1983, Leng1991).

It has been proved that ruminal microorganisms need nutrients for their development (Elias 1971, Wallace and Newbold 1994). Some researchers propose the rumen manipulation to develop a favorable ecosystem, with the increase of the total volatile fatty acids production (Ortiguez and Majdoub 2003), mainly propionic, the escape of ruminal fermentation of true protein, degradable protein in rumen (Elías 1983, El-Kadi *et al.* 2003) and long chain fatty acids (Voigt *et al.* 2004). Moreover, it is suggested the protozoan control and the increase of structural carbohydrates digestion by means of physical or chemical forages treatment and fermentable nitrogen addition (urea, ammonia) accompanied by micronutrients, such as sulfur, phosphorus, amino acids and peptides (Preston 1991).

Ruminal protein activators (RPA), in hard tacos of slow release, function as a formula that accelerates the ruminal digestion processes. These activators, whose formulation consist on a combination of protein meals, urea, molasses and minerals, were designed to provide nutrients synchronously to populations of ruminal cellulolytic microorganisms of bovine (D'Ascanio 2014). They are characterized by insalivate and the animals swallow them whole or in big pieces, demonstrable within the animal rumen. They are cylindrical, between 0.8 and 1 cm in diameter, with specific weight of 1.2kg L<sup>-1</sup> and compressive resistance between 8 and 12 kgf cm<sup>2</sup>. They are resistant to humidity between 8 and 12 h. The hard tacos dissolve their nutrients in the rumen slowly and synchronously during the day. They are used in feeding livestock rearing in the field, which under extensive conditions intake low nutritious quality forages, with crude protein (CP) concentration lower to 6%. Using the RPA is expected to maximize the fibrous forage intake and daily liveweight gain.

The objective of this research was to evaluate the effect of a RPA supplementation on the intake and *in vitro* digestibility of *Tetrachne dregei* grass, differed from autumn and ripe.

### Materials and Methods

The study was conducted in the field of Agricultural Experimental Station of INTA "San Luis" (33° 40'13" South, 65° 23'25" West, 500 m o.s.l), San Luis province. The *Tetrachne dregei* growth from the 2009-2010 period deferred from autumn was used.

proteica durante la mayor parte del año y su alto contenido de fibra. Por ello, cualquier intento de mejorar la producción del forraje, su calidad o su utilización, resultaría en un importante beneficio económico.

El deficiente aporte de nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos ruminales se traduce en disminución de la biomasa microbiana, reducción de la digestibilidad y del consumo total del animal, particularmente en los forrajes fibrosos (Elías1983, Leng1991).

Se ha comprobado que los microorganismos ruminales necesitan nutrientes que permitan su desarrollo (Elias 1971, Wallace y Newbold 1994). Algunos investigadores proponen la manipulación del rumen para desarrollar un ecosistema favorable, con el incremento de la producción de ácidos grasos volátiles totales (Ortiguez y Majdoub 2003), principalmente propiónico, el escape de la fermentación ruminal de proteína verdadera y proteína degradable en rumen (Elías 1983, El-Kadi *et al.* 2003), almidones y ácidos grasos de cadena larga (Voigt *et al.* 2004). Asimismo, se sugiere el control de los protozoarios y el aumento de la digestión de carbohidratos estructurales mediante el tratamiento físico o químico de los forrajes y la adición de nitrógeno fermentable (urea, amoniaco) acompañado de micronutrientes, como el azufre, fósforo, aminoácidos y péptidos (Preston 1991).

Los activadores proteicos ruminales (APR), en su forma de tacos duros de liberación lenta, funcionan como una fórmula que acelera los procesos de digestión ruminal. Estos activadores, cuya formulación comprende una combinación de harinas proteicas, urea, melaza y minerales, se diseñaron para aportar nutrientes sincrónicamente a las poblaciones de microorganismos celulolíticos ruminales de los bovinos (D'Ascanio 2014). Se caracterizan por ser insalivados y los animales los tragan enteros o en trozos de gran tamaño, comprobables dentro del rumen animal. Tienen forma cilíndrica, entre 0.8 y 1 cm de diámetro, con peso específico de 1.2kg L<sup>-1</sup> y resistencia a la compresión entre 8 y 12 kgf cm<sup>2</sup>. Son resistentes a la humedad entre 8 y 12 h. Los tacos duros disuelven sus nutrientes en el rumen de forma lenta y sincrónicamente en el transcurso del día. Se utilizan en la alimentación de animales de cría o recria en campo, que en condiciones extensivas consumen forrajes de baja calidad nutritiva, con concentración de proteína bruta (PB) inferior a 6%. Con el uso del APR, se pretende maximizar el consumo de forraje fibroso y la ganancia diaria de peso vivo.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la suplementación de un APR en el consumo y digestibilidad *in vivo* de la gramínea *Tetrachne dregei*, madura y diferida de otoño.

### Materiales y Métodos

El estudio se realizó en el campo de la Estación Experimental Agropecuaria del INTA "San Luis" (33° 40'13" Sur, 65° 23'25" Oeste, 500 msnm), provincia de San Luis. Se utilizó el crecimiento de *Tetrachne dregei*,

During the winter of 2010, 400 kilos rolls were made and stored indoors until the evaluation time. For the study of voluntary intake (VI) and dry matter *in vivo* digestibility (DMIVD), a total of 9 Aberdeen Angus castrated steers, of 18 months old and 280 kg of live weight (LW) were used under stabulation conditions. Before starting the experiment, they were dewormed with ivermectin, were identified with ear tags and individually weighed on a mechanical scale to adjust the VI. A completely randomized design was used, with three treatments per three replications. The treatments were:

T0= Control (*T. degreei*, without supplementation)

T1= *T. degreei* + 200 g of RPA

T2= *T. degreei* + 400 g of RPA

The experiment lasted 34 d, 30 of them were used for the adaptation of animals to the diet and four, to measure voluntary intake and *in vivo* digestibility for a total collection of feces. To estimate intake, a minimal refusal of 25% was set. The RPA was discontinuously supplied, three times a week (Monday, Wednesday and Friday), at a rate of 467 g and 934 g per steer in each supply (it represented the total weekly dose divided into three parts), for T1 and T2, respectively. It was verified that the animals do not intake the whole supplement the day they were given. Daily, the forage was supplied and weighed, the same as rejected. Samples from both were taken for their further analysis. Daily, feces were collected, weighed and samples were taken to estimate their dry matter. The samples were dried in an oven with forced air circulation at 60 °C until constant weight. The forage dried samples were ground in hammer mill until a particle size of 1 mm and were stored for subsequent chemical composition analysis. The DM was determined by forced air circulation at 105 °C during 4 h. The ashes (calcination) and CP (Kjeldahl NX6, 25) were determined by standard methods (Latimer 2012). The NDF and ADF, according to Goering and van Soest (1970) method. In addition, the DM *in vitro* digestibility (MDIVD) by Tilley and Terry (1963) method were estimated. The INFostat statistical software, version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012) was used for the results interpretation.

### Results and Discussion

Table 1 shows the chemical composition of the two foods used in the assay. The *T. degreei* composition was among the parameters indicated for ripe forages of low nutritional quality (National Research Council 2000). The activator composition was also found between the parameters in its formulation. For DMIVD, difference was found between the estimated in laboratory (40.5%) and that found in the field (46%) by the *in vivo* method (5.5%), when comparing the data of table 1 and 2. Goering and van Soest (1970) pointed out that the differences between *in vitro* and *in vivo* methods for digestibility estimates were in the order of 11%.

diferida de otoño, durante el período 2009-2010. En el invierno de 2010, se realizaron rollos de 400 kilos y se conservaron bajo techo hasta el momento de la evaluación. Para el estudio de consumo voluntario (CV) y digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS), se utilizaron 9 novillos castrados Aberdeen Angus, de 18 meses de edad y 280 kg de peso vivo (PV) en condiciones de estabulación. Antes de iniciar el experimento, se desparasitaron con ivermectina, se identificaron con caravanas y se pesaron individualmente en una báscula mecánica para ajustar el CV. Se empleó un diseño completamente aleatorizado, con tres tratamientos por tres repeticiones. Los tratamientos fueron:

T0= Control (*T. degreei*, sin suplementación)

T1= *T. degreei* + 200 g de APR

T2= *T. degreei* + 400 g de APR

El experimento duró 34 d, 30 se destinaron a la adaptación de los animales a la dieta y cuatro, a medir el consumo voluntario y digestibilidad *in vivo* por colección total de heces. Para estimar el consumo, se fijó un rechazo mínimo de 25 %. El APR se suministró de forma discontinua, tres veces por semana (lunes, miércoles y viernes), a razón de 467 g y 934 g por novillo en cada suministro (representó la dosis total semanal dividida en tres partes), para T1 y T2, respectivamente. Se verificó que los animales no consumieran todo el suplemento el día en que se les suministró. Diariamente, el forraje se suministró y pesó, al igual que el rechazo. Se tomaron muestras de ambos para su análisis posterior. Diariamente, se recolectaron las heces, se pesaron y se tomó de cada animal una muestra por día para estimar la materia seca. Las muestras se secaron en estufa con circulación de aire forzado a 60 °C hasta alcanzar el peso constante. Las muestras secas del forraje se molieron en molino de martillo hasta lograr un tamaño de partícula de 1 mm y se conservaron para su posterior análisis de composición química. La MS se determinó por circulación de aire forzado a 105 °C durante 4 h. Las cenizas (calcinación) y PB (Kjeldahl Nx6.25) se determinaron por métodos estándares (Latimer 2012). La FND y fibra FAD, según el método de Goering y van Soest (1970). Además, se estimó la digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) por el método de Tilley y Terry (1963). Para la interpretación de los resultados, se utilizó el programa estadístico INFostat, versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

### Resultados y Discusión

En la tabla 1 se muestra la composición química de los dos alimentos utilizados en el ensayo. La composición de *T. degreei* estuvo entre los parámetros indicados para forrajes maduros de baja calidad nutritiva (National Research Council 2000). La composición del activador también se encontró entre los parámetros previstos en su formulación. Para la DIVMS, se constató diferencia entre lo estimado en laboratorio (40.5 %) y lo hallado en el campo (46 %) por el método *in vivo* (5.5 %), al comparar los datos de la tabla 1 y 2. Goering y van Soest (1970) señalaron que las diferencias entre los métodos *in vitro* e *in vivo* para las estimaciones de digestibilidad

Table 1. Analysis of nutritional quality of foods used in the experiment

Foods	DM	CP	NDF	ADF	ASHES	DMID <sup>1</sup>
			%			
<i>Tetrachne dregei</i>	90.7	5.7	73.1	35.2	7.1	40.5
RPA	90.4	40.6	32.5	12.1	13.2	93.9

<sup>1</sup>DMID = Dry matter *in vitro* digestibility

Table 2 presents the estimated average partition of CP of the RPA, which was similar to that recommended by different authors for this type of protein supplement (Köster *et al.* 1997). *In vivo* estimates, made by Balbuena *et al.* (2002) determined degradation levels of CP near 60 % in cotton and soybean pellets, and close to 85% for sunflower, and very close to those used for RPA calculation in this experiment.

Koster *et al.* (1997) concluded that, when the

se encontraban en el orden de 11 %.

La tabla 2 presenta la partición promedio estimada de la PB del APR, que fue similar a lo recomendado por diferentes autores para este tipo de suplemento proteico (Köster *et al.* 1997). Estimaciones *in vivo*, realizadas por Balbuena *et al.* (2002) determinaron niveles de degradación de PB cercanos a 60 % en pellets de algodón y soja, y próximos a 85 % en el caso del girasol, muy cercanos a los utilizados para el cálculo del APR en este experimento.

Table 2. Estimated values for degradable protein (DP), non degradable (NDP) and calculated for CP from the total of NNP and urea in the RPA

	%			
Ruminal protein activator	DP <sup>1</sup>	NDP <sup>1</sup>	CP-NNP <sup>2</sup>	CP-Urea <sup>3</sup>
	77.52	22.48	29.55	28.44

<sup>1</sup>Estimated values from the requirement tables of the NRC (1996)

<sup>2</sup>Calculated values according to the CP total inclusion as NNP of the RPA (NRC 1996)

<sup>3</sup>Calculated values according to the CP total inclusion from the urea

amount of urea exceeds 75% of the total equivalent of digestible protein (DP), the response of all the criteria about the forage intake, OM and NDF digestion significantly decreases, therefore they suggest as maximum substitution point 50%. For the RPA, the higher amount of urea used with respect to the total equivalent of DP was 37%, which remained in the recommended limit. Koster *et al.* (1997), from the mentioned results, determined as minimum limit 25% equivalent as supplementary DP. This must come from the true protein to maximize forage intake and digestion that, for this product, was 62% above the minimum limit recommended.

The results of animal response are shown in table 3. The total dry matter intake (total DMI) and forage intake (forage DMI) was similar. Both indicators, in the supplemented treatments, showed differences with respect to control, and there was no difference between doses.

The DMIVD and digestible dry matter intake (DDMI) showed similar tendency. There were no significant differences between the two RPA doses. Both improved these indicators with respect to the control. As shown in table 4, the average increase was 9.3 and 33.6% for DMD and DDMI respectively, when subjecting the forage to supplementation with RPA to low dose of 200 g/animal/d.

The forage CP intake (forage CP) was lower in the

Köster *et al.* (1997) concluyeron que, cuando la cantidad de urea excede 75 % del total equivalente de proteína digerible (PD), la respuesta de todos los criterios acerca del consumo de forraje, digestión de MO y FND disminuye significativamente, por lo que sugieren como punto máximo de sustitución 50 %. Para el presente APR, la cantidad máxima de urea utilizada con respecto al total equivalente de la PD fue 37 %, por lo que se mantuvo en el límite recomendado. Köster *et al.* (1997), a partir de los resultados citados, determinaron como límite mínimo 25 % de equivalente como PD suplementaria. Esta debe provenir de la proteína verdadera para poder maximizar el consumo y digestión del forraje que, para este producto, fue de 62 % por encima del límite mínimo recomendado.

Los resultados de la respuesta animal se muestran en la tabla 3. El consumo de materia seca total (CMS total) y forraje (CMS forraje) fue similar. Ambos indicadores, en los tratamientos suplementados, mostraron diferencias con respecto al control, y no hubo diferencias entre dosis.

La DIVMS y el consumo de materia seca digestible (CMSD) mostraron tendencia similar. No hubo diferencias significativas entre las dos dosis del APR. Ambas mejoraron estos indicadores con respecto al control. Como se muestra en la tabla 4, el incremento promedio fue de 9.3 y 33.6 % para DMS y CMSD respectivamente, al someter al forraje a suplementación con el APR a dosis bajas de 200 g/animal/d.



Table 3. Results of the intake and digestibility of a ripe forage supplemented with RPA

Variables	Control	200 g RPA	400 g RPA	SE ( $\pm$ ) Signif.
Total DMI(g)	4012 <sup>a</sup>	4773 <sup>b</sup>	4955.17 <sup>b</sup>	122.69 P<0.001
Forage DMI (g)	4012 <sup>a</sup>	4593 <sup>b</sup>	4607.08 <sup>b</sup>	122.74 P<0.002
DMD (%)	46 <sup>a</sup>	50.3 <sup>b</sup>	51.7 <sup>b</sup>	0.774 P<0.001
DDMI (g)	1848 <sup>a</sup>	2469 <sup>b</sup>	2493.5 <sup>b</sup>	73.28 P<0.001
Forage CPI(g)	228.7 <sup>a</sup>	261.8 <sup>b</sup>	262.61 <sup>b</sup>	6.994 P<0.002
Total CPI(g)	228.7 <sup>a</sup>	336.1 <sup>b</sup>	408.63 <sup>c</sup>	6.994 P<0.001
Forage NDFI(g)	2932 <sup>a</sup>	3358 <sup>b</sup>	3368.79 <sup>b</sup>	89.722 P<0.002
Total NDFI(g)	2932 <sup>a</sup>	3426 <sup>b</sup>	3475.13 <sup>b</sup>	89.723 P<0.001
Forage ADFI(g)	1412 <sup>a</sup>	1617 <sup>b</sup>	1621.7 <sup>b</sup>	43.206 P<0.002
Total ADFI(g)	1412 <sup>a</sup>	1643 <sup>b</sup>	1660.55 <sup>b</sup>	43.204 P<0.001
Forage CDMI(g)	1521 <sup>a</sup>	1741 <sup>b</sup>	1746.08 <sup>b</sup>	46.519 P<0.002
DOMI (g)	1718 <sup>a</sup>	2297 <sup>b</sup>	2307.33 <sup>b</sup>	68.116 P<0.001
DPI (g)	160.1 <sup>a</sup>	240.7 <sup>b</sup>	297.07 <sup>c</sup>	4.898 P<0.001
OMD/PC (%)	7.51 <sup>a</sup>	6.83 <sup>b</sup>	2.51 <sup>c</sup>	0.111 P<0.001
DPI/DOMI (%)	9.3 <sup>a</sup>	10.5 <sup>b</sup>	12.93 <sup>b</sup>	0.191 P<0.001
Ingesta CP (%)	5.7	7.0	8.2	

Table 4. Percentage of increase of the main variables between the control and the dose of 200 g of RPA

Variables	Increase
Total Dry Matter Intake	18.9
Forage DM intake	14.5
DM <i>in vivo</i> digestibility	9.3
Digestible DM intake	33.6
Digestible Organic Matter Intake	33.7
Degradable Protein Intake	50.3

control than in the supplemented treatments, which not differ to each other, with 14.5 % of increase. With regard to the total CP intake (total CP), this indicator showed differences between all treatments, and it was increased as the RPA dose increased.

The NDF and ADF intake, total and of the forage

El consumo de PB del forraje (PB forraje) fue más bajo en el control que en los tratamientos suplementados, que no difirieron entre sí, con incremento de 14.5 %. Con respecto al consumo de PB total (PB total), este indicador mostró diferencias entre todos los tratamientos, y se incrementó a medida que aumentó la dosis de APR.

(total NDFI, forage NDFI, total ADFI, forage ADFI), as well as to that of cellulose and hemicellulose (forage CDMCEL) follow the same tendency, typical of the increase of the total intake of forage DM with the RPA addition. Effect was not observed between the doses of it.

The digestible organic matter intake (DOMI) was significantly different between the control and treatments, in those which the increase value was of 33.7 % (table 4), but there were not differences between the activator doses. On the other hand, the degradable protein intake (DPI) was different between treatments. This is typical of the addition of the different RPA doses, being 50.3% the increase with regard to the most efficient dose of the RPA, which was of 200 g (table 4).

Koster *et al.* (1996) determined that the most appropriate relation that should exist between the total DP and the DOM intake is approximately 11%. Therefore, from the total of the daily DOMI, as average should be 11% of DP, to ensure an optimal rumen fermentation process. When using this same relation DPI / DOMI, differences between each of treatments were found in this study, placing this one between the lower and higher doses of the RPA. When using an approximation based on the average efficiency of microbial yield on varied diets, the National Research Council (2000) suggested that DP requirements were, as average, 13% of the total DNT. The Agricultural Research Council & Commonwealth Agricultural Bureaux (1980) suggested mean values of 30 g microbial N / kg OM, apparently digestible in the rumen. When applying the microbial efficiency suggested by the Agricultural Research Council & Commonwealth Agricultural Bureaux (1980) and the National Research Council (2000), it seems to be that the supplementation used on low quality forages, must maintain a minimum in the relation DIP: TND from 12 to 13% approximately. This is possible when the supplements have concentrations higher than 20 % of CP. These relations are similar to those found in this experiment, being the closest 11%, determined by Koster *et al.* (1996.)

Moore *et al.* (1999) determined that the supplementation decreases forage voluntary intake, when the total intake of the supplemental TND was higher of 0.7% of LW, when the relation between the forage TND: CP was lower at 7 (adequate N) or when the voluntary forage intake during supplementation was higher than 1.75 % of the animal live weight. Therefore, a relation between forage and concentrate 60:40 could be inferred.

However, supplementation increases voluntary forage intake when the relation of forage TND: CP was higher than 7 (deficit N), and when voluntary forage intake was lower to that relation. Considering that the TND is equal to the OMD, then it can infer

Los consumos de FND y FAD totales y del forraje (CFND total, CFND forraje, CFAD total, CFAD forraje), así como el de celulosa y hemicelulosa (CMSCEL forraje) siguieron la misma tendencia, propia del aumento del consumo total de MS del forraje con la adición de APR. No se observó efecto entre las dosis del mismo.

El consumo de materia orgánica digestible (CMOD) fue significativamente diferente entre el control y los tratamientos, en los que el valor de incremento fue de 33.7 % (tabla 4), pero no hubo diferencias entre las dosis del activador. En cambio, el consumo de proteína degradable (CPD) fue diferente entre tratamientos. Esto es propio de la adición de las diferentes dosis del APR, siendo el incremento de 50.3 % con respecto a la dosis más eficiente del APR, que fue de 200 g (tabla 4).

Kôster *et al.* (1996) determinaron que la relación más apropiada que debe existir entre el consumo total de PD y el de MOD es de 11% aproximadamente. Por ello, del total de CMOD diario, como promedio debe ser 11% de PD, para asegurar un proceso óptimo de fermentación ruminal. Al utilizar esta misma relación CPD/CMOD, en este estudio se encontraron diferencias entre cada uno de los tratamientos, ubicándose esta entre las dosis menores y mayores del APR. Al usar una aproximación basada en la eficiencia de rendimiento microbiano promedio en dietas variadas, el National Research Council (2000) propuso que los requerimientos en PD eran, como promedio, 13 % del total de TND. El Agricultural Research Council & Commonwealth Agricultural Bureaux (1980) sugirió valores medios de 30 g N microbiano/kg de MO, aparentemente digestible en el rumen. Al aplicar la eficiencia microbiana sugerida por el Agricultural Research Council & Commonwealth Agricultural Bureaux (1980) y el National Research Council (2000), parece ser que la suplementación utilizada sobre forrajes de baja calidad, debe mantener un mínimo en la relación DIP: TND de 12 a 13 % aproximadamente. Esto es posible cuando los suplementos tienen concentraciones superiores a 20 % de PB. Estas relaciones son similares a las halladas en este experimento, siendo más cercana la del 11 %, determinada por Kôster *et al.* (1996).

Moore *et al.* (1999) determinaron que la suplementación disminuía el consumo voluntario de forraje, cuando el consumo total de TND suplementario era mayor de 0.7 % del PV, cuando la relación entre el TND del forraje: PB era menor a 7 (N adecuado) o cuando el consumo voluntario de forraje en el transcurso de la suplementación era mayor que 1.75 % del peso vivo del animal. Por ello, se podría inferir una relación entre forraje y concentrado de 60:40.

En cambio, la suplementación incrementó el consumo voluntario de forraje cuando la relación de TND del forraje: PB fue mayor a 7 (N deficitario), y cuando el consumo voluntario de forraje fue menor a dicha relación. Si se considera que el TND es igual a la DMO, entonces se puede inferir que estos resultados son concluyentes y determinantes para este experimento, ya que se ajustan a

that these results are conclusive and decisive for this experiment, as fitted to the established values (OMD: CP). This indicates that the response to forage intake in feeding systems with low quality forages depends, first, the contribution in supplementary CP as the main limiting factor.

Bowman *et al.* (2004) showed that the supplementation with nonstructural carbohydrates improves the forage intake and digestion, when animals intake forage poor in CP in relation to energy (OMD: CP > 7). However, it decreases forage intake and digestion, when grazing forages with adequate CP concentration in relation to energy (OMD: CP < 7).

Moore *et al.* (1999) indicated that the most of supplemented straws with different types of concentrated mixtures are placed in an OMD: CP relation between 4 and 8, in which a change in the OMI is achieved between - 0.5 to + 0.5, in % of the animal LW, which depends on how the supplements were mixed with the supplied straw. In this experiment, the exchange relation was 0.12

Heldt *et al.* (1997), when works with casein and different energy sources, obtained a similar response to Olson *et al.* (1997), who reached increases of 72 % in the DOMI with respect to the control, and 27 % when comparing high and low levels in the DPI. These authors concluded that the positive effect of supplementation with DP on the DOMI was due to the increase in the digestion and forage intake. This agrees with Owens *et al.* (1991) observations, who's showed that many of the benefits of supplementation with DP can be attributed to its effect on the forage intake and digestion.

Bodine and Purvis (2003), in an experiment with steers in icy native pastures, studied supplementation with corn and soybean meal, supplied alone and in different combinations. These authors found that the best relations in DWG are achieved between DOMI: CP (g) of 5.7 and DPI: TND (g) of 7.2, always referred to the total of diet.

Although in this study the animals receive supplementary doses much higher, close to 1 % of live weight, in the experiment in which the best response was achieved, at doses of 200 g of RPA, these relations were placed at 6.8 and 10.5, respectively. In the same experiment, the soybean meal performance was evaluated, at a rate of 0.3 % of LW, as a protein source of the same pastures. In this case, relations which were similar to those used in higher doses were obtained (400 g of RPA), of 4.8 vs. 5.6 and 15.0 vs. 12.8 for OMD: CP and DPI: DOMI, respectively.

As table 4 shows, the increase achieved with respect to the lower dose, being 18.9 and 14.5 % to one and another, respectively. These results agree with those reported by several authors, which indicated that the addition of protein to low quality forages causes increase in animals intake (Koster *et al.* 1996). The forage DMI in

los valores establecidos (DMO: PB). Esto indica que la respuesta al consumo del forraje en sistemas alimentarios con forrajes de baja calidad depende, en primer lugar, del aporte en PB suplementaria como principal factor limitante.

Bowman *et al.* (2004) señalaron que la suplementación con carbohidratos no estructurales mejora el consumo y gestión del forraje, cuando los animales consumen forrajes deficientes en PB en relación con la energía (DMO: PB > 7). Sin embargo, disminuye el consumo y la digestión del forraje, cuando pastorean forrajes con adecuada concentración de PC en relación con la energía (DMO: PB < 7).

Moore *et al.* (1999) indicaron que la mayoría de las pajas suplementadas con diferentes tipos de mezclas concentradas se ubican en una relación DMO: PB entre 4 y 8, en la que se logra un cambio en el CMO entre - 0.5 a + 0.5, en % del PV del animal, que depende de lo bien que se hallan mezclado los suplementos con la paja suministrada. En este experimento, la relación de cambio fue de 0.12.

Heldt *et al.* (1997), al trabajar con caseína y distintas fuentes de energía, obtuvieron una respuesta similar a la de Olson *et al.* (1997), quienes llegaron a incrementos en el CMOD de 72 % con respecto al control, y de 27 % al comparar altos y bajos niveles en el CPD. Estos autores concluyeron que el efecto positivo de la suplementación con PD en el CMOD se debió al aumento en la digestión y consumo del forraje. Esto concuerda con las observaciones de Owens *et al.* (1991), quienes señalaron que muchos de los beneficios de la suplementación con PD se pueden atribuir a su efecto en el consumo y la digestión del forraje.

Bodine y Purvis (2003), en un experimento con novillos en pasturas nativas heladas, estudiaron la suplementación con maíz y harina de soja, suministrados solos y en diferentes combinaciones. Estos autores encontraron que las mejores relaciones en GDP se logran entre CDMO: PB (g) de 5.7 y CPD: TND (g) de 7.2, siempre referidas al total de la dieta.

Si bien en este estudio los animales recibían dosis suplementarias mucho mayores, cercanas a 1 % del peso vivo, en el experimento en el que se logró la mejor respuesta, a dosis de 200 g de APR, estas relaciones se ubicaron en 6.8 y 10.5, respectivamente. En el mismo experimento, se evaluó el desempeño de la harina de soja, a razón de 0.3 % del PV, como fuente proteica de las mismas pasturas. En este caso, se obtuvieron relaciones que se asemejaron más a las utilizadas en dosis mayores (400 g de APR): 4.8 vs 5.6 y 15.0 vs 12.8 para DMO: PB y CPD: CMOD, respectivamente.

Como muestra la tabla 4, el incremento logrado con respecto a la dosis más baja, siendo del 18.9 y 14.5 % para uno y otro, respectivamente. Estos resultados coinciden con lo señalado por varios autores, que indicaron que la adición de proteína a forrajes de baja calidad provoca aumento en el consumo de los animales (Koster *et al.* 1996). El CMS forraje en porciento del peso vivo del animal se incrementó entre

percent of animal LW was increase between control and the lowest RPA dose, being 1.4 and 1.6 %, respectively. Moore *et al.* (1999), from the review of published work about supplementation effects, they showed that with these levels of forage intake the supplementation effects respond positively.

Sawyer *et al.* (2012) evaluated in fistulated cows in rumen different types of proteins (high and low ruminal degradability) at low supplementation levels, for *Eragrostis curvula* or *Sorghum bicolor* hay (4.1 % CP and 75 % NDF or 3.7 % CP and 74 % NDF on organic matter, respectively). These authors did not found positive response to lower doses of 160 g d<sup>-1</sup> CP, for using the N and NDF digestibility, whatever is the type of protein. However, with doses close to 390 g d<sup>-1</sup> of cottonseed meal, obtained positive response in ruminal NH<sub>3</sub> concentration, N urea and blood glucose and DM disappearance.

Held *et al.* (1997) and Olson *et al.* (1997), in studies with casein as a source of degradable high protein solubility and different energy sources, achieved similar responses, with increase of 72 % in the DOMI with respect to control, and 27 % compared with high and low levels in the DPI. These authors concluded that the positive effect of supplementation with DP on the DOMI is due to an increase in forage digestion and intake. This agrees with Owens *et al.* (1991) previous observations, which showed that many of the effects of supplementation with DP can be attributed to effects on forage intake and digestion. Minson (1990), in reviews of supplementation studies, verified that the true protein and non-protein nitrogen (NPN) were able to stimulate forage intake.

The forages of the regions in which this study was carried out at certain times of the year they ripe or icy, or experience both affectations, which markedly reduce the CP concentration lower to 6 %, they responded positively to the use of RPA. The results between 7 and 8 % of the intake in CP and their responses on the DMI and DMD coincide with the values of 8%, recommended as a practical limit to achieve adequate concentration of nitrogen in the rumen fluid necessary for the flora growth and for the degradation of the fibrous structure of grasses (Elias 1983).

These results show that to achieve higher forage intake and higher weight gain, with lower use of supplementary concentrates, not only would be necessary to consider the DPI: DOMI relation, but should be consider other factors, linked to the flow of free amino acids and peptides towards the animal intestine, in order to efficiently use the total energy of the diet.

It is obvious that the RPA supply in low dose increased the intake of *T. degrei* forage deferred autumn and ripe in 14 %, the DM *in vivo* digestibility and the digestible DMTI of animals in 37%, due to the increase in digestibility of the main components of the cell wall

el control y la dosis más baja del APR, siendo de 1.4 y 1.6 %, respectivamente. Moore *et al.* (1999), en un estudio a partir de una revisión de trabajos publicados sobre los efectos de la suplementación, indicaron que con estos niveles de consumo del forraje los efectos a la suplementación responden positivamente.

Sawyer *et al.* (2012) evaluaron en vacas fistuladas en rumen diferentes tipos de proteínas (alta y baja degradabilidad ruminal) a bajos niveles de suplementación, para heno de *Eragrostis curvula* o de *Sorghum bicolor* (4.1 % PB y 75 % FND o 3.7 % PB y 74 % FND sobre materia orgánica, respectivamente). Estos autores no encontraron respuesta positiva a dosis menores de 160 g d<sup>-1</sup> de PC, para el uso del N y la digestibilidad de la FND, sea cual fuera el tipo de proteína. Sin embargo, con dosis próximas a 390 g d<sup>-1</sup> de harina de semilla de algodón, obtuvieron respuesta positiva en la concentración de NH<sub>3</sub> ruminal, N ureico y glucosa sanguínea y desaparición de la MS.

Heldt *et al.* (1997) y Olson *et al.* (1997), en estudios con caseína como fuente de proteína degradable de alta solubilidad y distintas fuentes de energía, lograron respuestas similares, con incremento de 72 % en el CMOD con respecto al control, y de 27 % en comparación con altos y bajos niveles en el CPD. Estos autores concluyeron que el efecto positivo de la suplementación con PD en el CMOD se debe a un aumento en la digestión y el consumo del forraje. Esto concuerda con las observaciones previas de Owens *et al.* (1991), quienes señalaron que muchos de los efectos de la suplementación con PD se pueden atribuir a efectos en el consumo y la digestión del forraje. Minson (1990), en revisiones de estudios de suplementación, constató que la proteína verdadera y el nitrógeno no proteico (NNP) eran capaces de estimular el consumo de forraje.

Los forrajes de las regiones en las que se desarrolló este estudio en determinados momentos del año se maduran o hielan, o experimentan ambas afectaciones, que descienden marcadamente la concentración de PB inferior al 6 %, responderían positivamente a la utilización del APR. Los resultados entre 7 y 8 % de la ingesta en PB y sus respuestas en el CMS y DMS coinciden con los valores de 8 %, recomendados como límite práctico para lograr adecuada concentración de nitrógeno en el líquido ruminal necesario para el crecimiento de la flora y para la degradación de la estructura fibrosa de los pastos (Elías 1983).

Estos resultados indican que para lograr consumos máximos de forraje y máxima ganancia de peso, con mínima utilización de concentrados suplementarios, no solo sería necesario considerar la relación CPD: CMOD, sino que habría que considerar otros factores, vinculados al flujo de aminoácidos y péptidos libres hacia el intestino del animal, con el propósito de usar eficientemente la energía total de la dieta.

Es evidente que el suministro del APR en bajas dosis incrementó el consumo del forraje maduro diferido de otoño de *T. degrei* en 14 %, la digestibilidad *in vivo* de la MS y el CTMS digestible de los animales en 37 %,



(NDF and ADF), which opens a new technological window in the digestion processes of forages highly lignified.

debido al aumento en digestibilidad de los componentes fundamentales de la pared celular (FND y FAD), lo que abre una nueva ventana tecnológica en los procesos de digestión de forrajes altamente lignificados.

### References

- Agricultural Research Council & Commonwealth Agricultural Bureaux 1980. The Nutrient requirements of ruminant livestock: technical review. Agricultural Research Council-Commonwealth Agricultural Bureaux, 376 p., ISBN: 978-0-85198-459-9, Available: <[https://books.google.com/cu/books?id=m2g\\_AAAAYAAJ&source=gbs\\_navlinks\\_s&redir\\_esc=y](https://books.google.com/cu/books?id=m2g_AAAAYAAJ&source=gbs_navlinks_s&redir_esc=y)>, [Consulted: April 4, 2016].
- Balbuena, O., Rochinotti, D., Arakaki, C. L., Kucseva, C. D., Somma de Feré, G. R., Slanac, A. L. & Koza, G. A. 2002. “Efecto de la suplementación proteica sobre la digestibilidad y flujo nitrogenado en novillos consumiendo pasto estrella”. *Revista Argentina de Producción Animal*, 22 (1): 13, ISSN: 0326-0550, 2314-324X.
- Bodine, T. N. & Purvis, H. T. 2003. “Effects of supplemental energy and/or degradable intake protein on performance, grazing behavior, intake, digestibility, and fecal and blood indices by beef steers grazed on dormant native tallgrass prairie”. *Journal of Animal Science*, 81 (1): 304–317, ISSN: 1525-3163, DOI: /2003.811304x.
- Bowman, J. G. P., Sowell, B. F., Surber, L. M. M. & Daniels, T. K. 2004. “Nonstructural carbohydrate supplementation of yearling heifers and range beef cows”. *Journal of Animal Science*, 82 (9): 2724–2733, ISSN: 1525-3163, DOI: /2004.8292724x.
- Chiossone, G. O. 2011. “Pastizales naturales de Argentina”. In: IX Congreso Internacional de Pastizales, Santa Fe, Argentina: INTA y La Asociación Argentina de Pastizales (AAMPN), Available: <<http://www.pregonagropecuario.com/cat.php?txt=2027>>, [Consulted: April 4, 2016].
- D’Ascanio, G. 2014. Formulación aceleradora de la celulólisis ruminal. no. INPI P-265/03, Inst. Instituto Nacional de la Propiedad Industrial, Administración Nacional de Patentes, Argentina.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat. version 2012, [Windows], Universidad Nacional de Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, Available: <<http://www.infostat.com.ar/>>.
- Elias, A. 1971. The rumen bacteria of animals feed on a high-molasses-urea-diets. Ph.D. Thesis, University of Aberdeen, Escocia.
- Eliás, A. 1983. “Digestión de pastos y forrajes tropicales”. In: Ugarte J., Herrera R., Ruiz R., García R., Vázquez C. & Senra A. (eds.), *Los pastos en Cuba*, vol. 2, La Habana, Cuba: Instituto de Ciencia Animal, pp. 187–246, Available: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=catalco.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=030111>>, [Consulted: March 2, 2016].
- El-Kadi, S. W., Sunny, N. E., Oba, M., Owens, S. L. & Bequette, B. J. 2003. “Glucose metabolism by the gastrointestinal tract of sheep as affected by protein supply”. In: Souffrant W. B. & Metges C. C., *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism*, Netherlands: Wageningen Academic Pub, pp. 401–405, ISBN: 978-90-76998-24-4.
- Goering, H. K. & van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). (ser. Agriculture Handbook, no. ser. 379), Washington, DC., USA: U.S. Agricultural Research Service, 24 p.
- Heldt, J. S., Cochran, R. C., Mathis, C. P., Woods, B. C., Stokka, G. L., Olson, K. C., Titgemeyer, E. C. & Nagaraja, T. G. 1997. “Evaluation of the effects of carbohydrate source and level of degradable intake protein on the intake and digestion of tallgrass-prairie hay by beef steers”. In: *Cattlemen’s Day*, Manhattan, KS: Kansas State University. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, pp. 60–62, Available: <<http://krex.k-state.edu/dspace/handle/2097/4816>>, [Consulted: February 16, 2016].
- Köster, H. H., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C., Vanzant, E. S., Abdelgadir, I. & St-Jean, G. 1996. “Effect of increasing degradable intake protein on intake and digestion of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef cows”. *Journal of Animal Science*, 74 (10): 2473–2481, ISSN: 0021-8812, DOI: /1996.74102473x.
- Köster, H. H., Cochran, R. C., Titgemeyer, E. C., Vanzant, E. S., Nagaraja, T. G., Kreikemeier, K. K. & St Jean, G. 1997. “Effect of increasing proportion of supplemental nitrogen from urea on intake and utilization of low-quality, tallgrass-prairie forage by beef steers”. *Journal of Animal Science*, 75 (5): 1393–1399, ISSN: 0021-8812, DOI: /1997.7551393x.
- Latimer, G. W. 2012. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 19th ed., Gaithersburg, Md.: AOAC International, ISBN: 978-0-935584-83-7, Available: <[http://www.amazon.com/Official-Methods-Analysis-OFFICIAL-ANALYSIS/dp/0935584838/ref=pd\\_sim\\_sbs\\_14\\_1?ie=UTF8&dpID=31iikC-xl2L&dpSrc=sims&preST=\\_AC\\_UL160\\_SR160%2C160\\_&refRID=101AB94246X0EM9N7XMW](http://www.amazon.com/Official-Methods-Analysis-OFFICIAL-ANALYSIS/dp/0935584838/ref=pd_sim_sbs_14_1?ie=UTF8&dpID=31iikC-xl2L&dpSrc=sims&preST=_AC_UL160_SR160%2C160_&refRID=101AB94246X0EM9N7XMW)>, [Consulted: April 1, 2016].
- Leng, R. A. 1991. Application of biotechnology to nutrition of animals in developing countries. (ser. Animal Production and Health Paper, no. ser. 90), Roma, Italia: FAO, 148 p., ISBN: 978-92-5-103035-6, Available: <<http://www.cabdirect.org/abstracts/19916781562.html;jsessionid=3A454DC72C0D5E491DAF66478478F28B>>, [Consulted: April 6, 2016].
- Minson, D. J. 1990. Forage in ruminant nutrition. Academic Press, 520 p., ISBN: 978-0-12-498310-6.
- Moore, J. E., Brant, M. H., Kunkle, W. E. & Hopkins, D. I. 1999. “Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance”. *Journal of Animal Science*, 77 (Suppl. 2): 122, ISSN: 0021-8812, 1525-3163.
- National Research Council 2000. *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. 7th ed., Washington, D.C.: National Academies Press, ISBN: 978-0-309-06934-2, Available: <<http://www.nap.edu/catalog/9791>>, [Consulted: April 6, 2016].
- Olson, K. C., Cochran, R. C., Jones, T. J., Vanzant, E. S. & Titgemeyer, E. C. 1997. “Effects of various supplemental starch and protein levels on ruminal fermentation and liquid passage of beef steers fed tallgrass-prairie hay”. In: *Cattlemen’s Day*, Manhattan, KS: Kansas State University. Agricultural Experiment Station and Cooperative Extension Service, pp. 53–55, Available: <<http://krex.k-state.edu/dspace/handle/2097/4813>>, [Consulted: February 16, 2016].

- Ortigueza, M., J. & Majdoub, L. 2003. "Ruminal acetate propionate pattern and nitrogenous fluxes across splanchnic and hind limb tissues in growing lambs". In: Souffrant W. B. & Metges C. C., Progress in Research on Energy and Protein Metabolism, Wageningen Academic Pub, pp. 213–217, ISBN: 978-90-76998-24-4.
- Owens, F. N., Garza, J. & Dubeski, P. 1991. "Advances in amino acid and N nutrition in grazing ruminants". In: McCollum F. T. & Judkins M. B. (eds.), II Grazing Livestock Nutritional Conference, Stillwater, Oklahoma: Agric. Exp. Sta., pp. 109–129, MP-133.
- Preston, T. R. 1991. "Principios de alimentación del ganado para el doble propósito a partir de los recursos tropicales". In: Memoria del Seminario Internacional sobre Lechería Tropical, vol. 2, Villahermosa, Tabasco, México: FIRA, BANXICO, pp. 14–47.
- Sala, O. E., Parton, W. J., Joyce, L. A. & Lauenroth, W. K. 1988. "Primary Production of the Central Grassland Region of the United States". Ecology, 69 (1): 40–45, ISSN: 0012-9658, DOI: 10.2307/1943158.
- Sawyer, J. E., Mulliniks, J. T., Waterman, R. C. & Petersen, M. K. 2012. "Influence of protein type and level on nitrogen and forage use in cows consuming low-quality forage". Journal of Animal Science, 90 (7): 2324–2330, ISSN: 0021-8812, 1525-3163, DOI: 10.2527/jas.2011-4782.
- Tilley, J. M. A. & Terry, R. A. 1963. "A Two-Stage Technique for the *in vitro* Digestion of Forage Crops". Grass and Forage Science, 18 (2): 104–111, ISSN: 1365-2494, DOI: 10.1111/j.1365-2494.1963.tb00335.x.
- Voigt, J., Guafar, K., Hagemester, M., Kaintz, W. & Precht, D. 2004. "Fat vs. starch as energy sources for high yielding lactating dairy cows". In: Souffrant W. B. & Metges C. C. (eds.), Progress in Research on Energy and Protein Metabolism, Wageningen Academic Publishers, pp. 4–5, ISBN: 978-90-76998-24-4, Available: <<http://www.amazon.com/Progress-Research-Protein-Metabolism-Scientific/dp/9076998248>>, [Consulted: April 4, 2016].
- Wallace, R. J. & Newbold, C. J. 1994. "Rumer fermentation and its manipulation: the development of yeast cultures as feed additives". In: Lyons T. P., Biotechnology in the Feed Industry, Nicholasville, Kentucky: Alltech Technical Publications, p. 173, ISBN: 978-1-897676-51-6.

**Received: June 8, 2015**