



**JULIA DIANE LIMA DIAS**

**PARTIAL REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL WITH  
CORN DISTILLERS DRIED GRAINS WITH YEAST FOR  
DAIRY COWS**

**LAVRAS - MG**

**2023**

**JULIA DIANE LIMA DIAS**

**PARTIAL REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL WITH CORN DISTILLERS  
DRIED GRAINS WITH YEAST FOR DAIRY COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras. Como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Zootecnia, para a obtenção do Título de Doutor.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira  
Orientador

**LAVRAS - MG  
2023**

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

Dias, Julia Diane Lima.

Partial replacement of soybean meal with corn distillers dried grains with yeast for dairy cows / Julia Diane Lima Dias. – Lavras : UFLA, 2023.

105 p. : il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2023.

Bibliografia.

1. Gado de leite 2. Grãos de destilaria. 3. Co-produto de milho. I. Pereira, Marcos Neves. II. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**Julia D. Lima Dias**

**Substituição parcial de farelo de soja por grãos de destilaria de alta proteína com levedura para vacas em lactação**

**Partial replacement of soybean meal with corn distillers dried grains with yeast for dairy cows**

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

APROVADA em 29 de dezembro de 2021.

Dr. Marcos Neves Pereira - DZO UFLA

Dr<sup>a</sup>. Marina de Arruda Camargo Danés – DZO UFLA

Dr. Milton Luiz Moreira Lima – UFG

Dr<sup>a</sup>. Ozana de Fátima Zacaroni – UFG

Dr<sup>a</sup>. Renata Apocalypse Nogueira Pereira - EPAMIG

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira

Orientador

**LAVRAS - MG**

**2023**

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu filho José Heitor. Ao meu amado Antônio Augusto. Vocês são a luz dos meus olhos, meu caminho e minha razão. Não há outro motivo para minha vida, a não ser o amor por vocês.

Ao meu maior exemplo, meu maior ideal, minha mãe Diana.

Aos meus melhores amigos, meus irmãos Jessica e Gabriel.

Ao meu pai Rogério.

Dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus grandes companheiros do Grupo do Leite por toda ajuda, apoio e dedicação. Obrigada por me receberem nessa família.

Ao meu marido Antônio, por ser meu parceiro e meu apoio.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial a Rayana Brito e Josiane Santos por imensa ajuda na condução desse trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Zootecnia (DZO), pela oportunidade concedida para realização do doutorado. Aos professores e funcionários do Departamento de Zootecnia (DZO). Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento a esse trabalho.

À professora Marina Danés, por ser minha co-orientadora e amiga.

Ao professor Marcos Neves Pereira pelo seu tempo e orientação. À Dr.<sup>a</sup> Renata Apocalypse Nogueira Pereira pelo apoio.

À equipe da Fazenda São Francisco, em especial ao Sebastião (Tião), Geraldo e Josie.

Aos bolsistas de iniciação científica por todo auxílio.

A todos os amigos, e em especial ao Gustavo Cariêlo, Humberto Camargo, Fernanda Gomes, Eugenio Barbosa, tão presentes nessa caminhada.

## RESUMO

Objetivou-se avaliar a substituição parcial da proteína bruta (PB) de farelo de soja (FS; 49,2% PB) por grãos de destilaria de alta proteína com levedura (DDGY; 50,2% PB) em dieta de vacas em lactação. As dietas continham em média 16,7% de PB na matéria seca (MS). Trinta e duas vacas holandesas foram alimentadas individualmente por duas semanas de padronização e por oito semanas de comparação. Os animais foram blocados e alocados a dieta controle (CTL; 17,8% FS na MS) ou DDGY (11,6% FS e 6,3% DDGY na MS). A inclusão de DDGY representou 3,3% da PB da dieta. Foram avaliados o desempenho leiteiro, consumo, digestibilidade de nutrientes, concentração plasmática de N-ureico e glicose, e comportamento de ingestão. A cinética de degradação ruminal da PB do DDGY e do FS foi determinada *in situ* e a digestibilidade intestinal da proteína não degradável no rúmen (PNDR) das fontes proteicas foi determinada *in vitro*. Comparado ao FS, DDGY teve maior fração proteica indigestível C (38,5 vs. 3,3% da PB), fração proteica instantaneamente degradável A semelhante (13,7 vs. 17,7%), e menor fração lentamente degradável B (43,5 vs. 83,0%). O DDGY também teve menor taxa fracional de degradação da fração B comparado ao FS (4,4 vs. 8,5 %/h). O DDGY teve menor proporção da PB degradada no rúmen, considerando taxa de passagem de 4 a 7%/h. A digestibilidade intestinal do DDGY foi menor que do FS (61,0 vs. 50,7% da PNDR no resíduo de 16 h de incubação). DDGY e FS tiveram digestibilidade intestinal baixa, no entanto a redução foi proporcional para os dois alimentos. A dieta com DDGY aumentou a produção de leite (32,2 vs. 31,3 kg/d), sem efeito sobre o consumo de MS (22,3 kg/d) e aumentou a eficiência alimentar (1,48 vs. 1,42). O DDGY tendeu a aumentar a produção diária de caseína (0,806 vs. 0,779 kg/d) e reduziu a concentração de N-ureico no leite (17,1 vs. 14,1 mg/dL) e no plasma (19,1 vs. 16,5 mg/dL, média de 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 20 h pós alimentação). Não houve efeito sobre a digestibilidade aparente no trato total da MS, matéria orgânica, amido e fibra em detergente neutro e sobre a excreção urinária de alantoína e a concentração de glicose plasmática. Vacas no DDGY tenderam a comer por menos tempo (272 vs. 299 min./d), sem efeito sobre o tempo de ruminação (460 min./d), aumentaram a proporção do consumo à tarde (44,0 vs. 37,6%). A frequência, duração e tamanho das refeições não diferiu. A substituição parcial de FS por DDGY não teve efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes, consumo e produção de proteína microbiana no rúmen e afetou o comportamento alimentar, aumentou a produção de leite e a eficiência alimentar. A dieta com DDGY reduziu a concentração de N-ureico no plasma e no leite, suportando a estimativa *in situ* de maior suprimento de PNDR com DDGY, comparado ao FS.

**Palavras-chave:** proteína, gado de leite, grãos de destilaria, coproduto de milho

## ABSTRACT

This experiment evaluated the partial replacement of soybean meal (SBM) with distillers dried grains with yeast (DDGY) at the same diet crude protein (CP) content for dairy cows. Compared to SBM (49.2% CP), the DDGY (50.2% CP) had higher in situ rumen undegradable CP (RUP) and lower in vitro RUP intestinal digestibility. Thirty-two Holstein cows were individually fed a standard diet for 2 weeks and treatments control (CTL) or DDGY for 8 weeks. Diets had 16.7% CP and the inclusion of SBM was 17.8% in CTL and 11.6% in DDGY. In the DDGY diet, the inclusion of DDGY was 6.3%, representing 3.3% of diet CP. Data were analyzed with a repeated measures approach. Significance was declared at  $P \leq 0.05$  and trends at  $0.05 < P \leq 0.10$ . There was no significant interaction between treatment and time for any variable measured over time. The DDGY increased milk yield (32.2 vs 31.3 kg/d) at similar dry matter intake (DMI; 22.3 kg/d), increasing the milk to intake ratio (1.48 vs 1.42). The positive effect of DDGY on milk yield was fast acting and consistent throughout the experiment. The DDGY tended to increase the yields of milk casein and protein. The concentrations in milk and the daily yields of fat and lactose did not differ. The DDGY reduced urea-N in milk (14.1 vs 17.1 mg/dL) and plasma (16.5 vs 19.1 mg/dL, average of 0, 2, 4, 8, 12, 16, and 20 hours post-feeding). The total tract apparent digestibility of dry matter, organic matter, starch, and neutral detergent fiber, rumen microbial yield, and plasma glucose concentration did not differ. The DDGY tended to reduce eating time (272 vs 299 min/d) and had no effect on rumination time (460 min/d). The DDGY increased the proportion of daily intake in the afternoon (44.0 vs 37.6%). In the morning (0700-1300 h), DDGY increased the refusal for feed particles > 19 mm (69.3 vs 93.7% of predicted intake) and the selection in favor of particles < 8 mm (120 vs 101% of predicted intake). The frequency, duration, and size of meals did not differ. The partial replacement of SBM with DDGY had no effect on diet digestibility, intake, and rumen microbial yield, affected eating behavior, improved milk yield and feed efficiency, and reduced plasma and milk urea-N, supporting the in situ estimation of higher RUP supply in DDGY than in SBM.

**Keywords:** corn distillers dried grains, ethanol coproduct, protein, yeast coproduct



## Resumo interpretativo

### Substituição parcial de farelo de soja por grãos de destilaria de alta proteína com levedura para vacas em lactação

Elaborado por Julia Diane Lima Dias orientada por Marcos Neves Pereira

A produção de etanol combustível de milho no Brasil é incipiente, com possibilidade de expansão. A indústria de etanol de milho gera diversos coprodutos úteis na alimentação de ruminantes. O principal coproduto são os grãos de destilaria com solutos (GDS). Esse alimento proteico varia quanto a composição, teor de proteína e valor nutricional, de acordo com a tecnologia de produção de etanol empregada. Com o para fracionamento do grão de milho antes da fermentação para produzir etanol obtêm-se os GDS de alta proteína. Os objetivos desse estudo foram: caracterizar GDS de alta proteína produzido no Brasil; avaliar o desempenho de vacas em lactação com substituição parcial do farelo de soja por GDS de alta proteína na dieta. Os GDS de alta proteína foram incubados no rúmen de vacas em lactação fistuladas para caracterizar a degradação ruminal desse alimento. A digestibilidade da proteína não degradável no rúmen também foi mensurada. A descrição da proteína do alimento em frações rapidamente degradável, lentamente degradável no rúmen e indigestível é fundamental para formulação de dietas. Para avaliação de desempenho 32 vacas em lactação divididas em dois grupos receberam duas dietas por 56 dias. A dieta controle continha farelo de soja, que foi substituído parcialmente por GDS de alta proteína (6,3% da matéria seca dietética) na dieta tratamento. As dietas foram iso-proteicas. Vacas que consumiram os GDS de alta proteína produziram mais leite (31,3 vs. 32,2 kg/d), mais caseína (+ 27 g/d) e tiveram maior eficiência alimentar. Vacas no tratamento tiveram menor concentração de N-ureico no leite (17,1 vs. 14,1 mg/dL) plasma, que sinaliza melhor utilização da proteína dietética para produção de leite. A substituição parcial do farelo de soja por GDS de alta proteína foi benéfica à produção e eficiência alimentar de vacas em lactação.

Caracterização dos GDS de alta proteína e formulação de dietas controle e com substituição parcial do farelo de soja por GDS de alta proteína

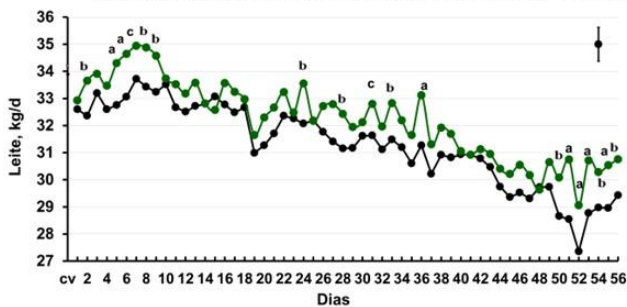


	CTL	GDS
Silagem de milho	40.8	40.5
Feno de aveia	4.7	4.8
Farelo de soja	17.8	11.6
GDS de alta proteína		6.3
Caroço de algodão	8.3	8.4
Milho reidratado ensilado	14.7	14.7
Polpa cítrica	11.0	11.0
PB	16.6	16.7
FDN	29.2	31.4
Amido	26.6	26.9
Cinzas	6.0	5.8
Extrato etéreo	4.3	4.2

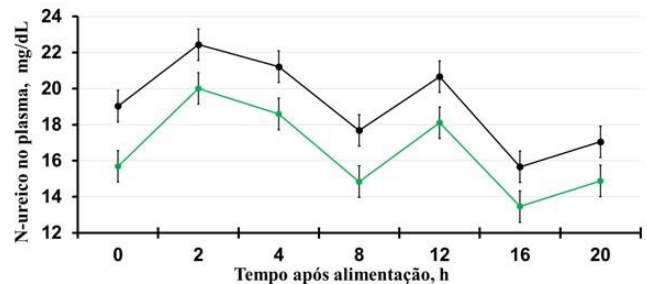
Avaliação do uso de GDS em substituição parcial ao farelo de soja para vacas em lactação



Dieta com GDS de alta proteína e farelo de soja aumentou produção de leite e eficiência de uso no nitrogênio para produção de leite.



Produção de leite na dieta controle (●) ou GDS de alta proteína (●).  $P = 0.01$  para efeito de tratamento,  $P < 0.01$  para efeito de dia  $P = 0.99$  para interação tratamento x dia.



Nitrogênio ureico no plasma na dieta controle (●) ou GDS de alta proteína (●).  $P < 0.01$  para efeito de tratamento e hora e  $P = 0.84$  para interação entre tratamento e hora.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO 1 USO DE COPRODUTOS DE ETANOL DE MILHO NA

ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS.....	10
1.1 INTRODUÇÃO.....	10
1.2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	11
1.2.1 Produção de etanol de milho e coprodutos para alimentação animal .....	11
1.2.2 Proteínas do grão de milho .....	15
1.2.3 Composição e valor nutricional de coprodutos do milho .....	16
1.2.4 Farelo de glúten de milho fibroso e farelo de glúten de milho proteico.....	17
1.2.5 Gérmen de milho .....	17
1.2.6 Grãos de destilaria com solutos .....	19
1.2.7 Degradação ruminal e digestibilidade da proteína de grãos de destilaria.....	25
1.2.8 Palatabilidade e digestibilidade de alimentos contendo leveduras: .....	35
1.2.9 Uso de coprodutos do milho na alimentação de vacas em lactação e desempenho leiteiro.....	37
1.2.10 Uso de grãos de destilaria secos ou úmidos e desempenho na lactação .....	37
1.2.11 Importância da qualidade proteica dos grãos de destilaria no desempenho leiteiro ....	39
1.2.12 Teor de extrato etéreo e ácidos graxos dos grãos de destilaria e desempenho na lactação.....	48
1.3 REFERÊNCIAS .....	51

### CAPÍTULO 2 USO DE GRÃOS DE DESTILARIA DE ALTA PROTEÍNA COM

LEVEDURA E ESTRESSE POR CALOR EM VACAS EM LACTAÇÃO .....	61
2.1 INTRODUÇÃO:.....	61
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS:.....	62
2.3 RESULTADOS: .....	64
2.4 TABELAS E FIGURAS:.....	66
2.5 REFERÊNCIAS: .....	69

### SEGUNDA PARTE – ARTIGO .....

INTRODUCTION .....	73
MATERIALS AND METHODS .....	74
<i>In situ rumen incubation and in vitro intestinal digestibility of protein sources</i> .....	74
<i>Location, Cows, and Experimental Design</i> .....	76
<i>Feed Management, Variables, and Analytical Procedures</i> .....	77
<i>Statistical Analysis</i> .....	80
RESULTS .....	81
DISCUSSION.....	83
CONCLUSIONS .....	88
REFERENCES .....	88
TABLES AND FIGURES.....	95

## **CAPÍTULO 1      USO DE COPRODUTOS DE ETANOL DE MILHO NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS**

### **1.1 INTRODUÇÃO**

A produção de etanol combustível de milho está crescendo no mundo e no Brasil. Os maiores produtores de etanol são os Estados Unidos e o Brasil, com 56,7 e 33,1 bilhões de litros em 2019, respectivamente (Renewable Fuels Association, 2020; Confederação Nacional da Agricultura, 2020). No Brasil apenas 4,7% da produção de etanol vem do milho, a maior cultura utilizada na indústria nacional é a cana-de-açúcar. Nos Estados Unidos mais de 95% do etanol é produzido do milho (Renewable Fuels Association, 2020). O uso do milho para etanol no Brasil é muito pequeno, comparado ao mercado norte-americano, e tem potencial de expansão. Os grãos de destilaria com solutos (GDS) são o principal coproduto do etanol de milho, e são fonte importante de proteína e energia na alimentação de ruminantes (Liu, 2011).

O desenvolvimento pela indústria de métodos de fracionamento do grão antes da fermentação para produzir etanol levou ao surgimento de GDS com alto teor de proteína e baixo teor de gordura (Majoni et al., 2011). Teor de extrato etéreo mais baixo, e proteína de alta qualidade e digestibilidade nos GDS são características desejáveis para a alimentação de vacas em lactação. A disponibilidade de GDS com essas características vem crescendo (US Grain Council, 2012), e renovou o interesse em pesquisa com GDS de alto teor de proteína e baixo teor de gordura (Bronw e Bradford, 2020; Lobos et al., 2021).

Características do grão podem influenciar a composição e o valor nutricional dos coprodutos do etanol. A cinética de degradação ruminal dos GDS difere com o tipo de grão usado na fabricação do combustível. Os GDS de trigo são degradados mais rapidamente e mais extensivamente no rúmen que GDS de milho (Li et al., 2012). No mercado brasileiro o milho é predominantemente duro e de baixa digestibilidade, comparado ao milho norte-americano (Correa et al., 2002). O tipo e a quantidade de proteína presente no endosperma estão relacionados a dureza do grão (Pratt et al., 1995). O endosperma vítreo tem maior teor de zeína comparado ao endosperma farináceo (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993; Landry et al., 2004). A zeína tem alta proporção de resíduos hidrofóbicos, tais como a prolina (Shukla e Cheryan, 2001), que lhe confere resistência à degradação ruminal (Ivan et al., 1996). A zeína é composta pelas subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , e  $\delta$ . A proporção de  $\alpha$ -zeína é maior no endosperma farináceo, enquanto a  $\gamma$ -zeína é predominante no endosperma vítreo (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993).

A quantidade de levedura adicionada aos GDS varia de fábrica para fábrica e também pode influenciar a composição final deste coproduto (Belyea et al., 2004). Recentemente estudo

de degradação *in vitro* mostrou que GDS brasileiro e norte-americano diferiram quanto a digestibilidade da matéria seca (MS), ainda que oriundos da mesma tecnologia de produção de etanol (Palowski et al., 2021).

Os objetivos do primeiro experimento nesse projeto foram: 1) caracterizar os GDS de alta proteína com levedura quanto a cinética de degradação ruminal, digestibilidade e composição em aminoácidos. 2) avaliar o desempenho de vacas em lactação em dieta com substituição parcial de farelo de soja por GDS de alta proteína com levedura.

## 1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.2.1 Produção de etanol de milho e coprodutos para alimentação animal

O etanol é uma fonte de energia renovável. O interesse no desenvolvimento da produção de etanol combustível é justificado pelo alto impacto do setor de transportes na emissão de gases do efeito estufa e a grande dependência desse setor por fontes fósseis de combustível. O etanol pode ser produzido a partir de diversas biomassas, como açúcares, amido e celulose. O etanol de açúcar e de amido é chamado de primeira geração, já o oriundo de celulose é chamado de segunda geração (Kumar e Singh, 2019).

O Brasil é o segundo produtor mundial de etanol, atrás apenas dos Estados Unidos, que produziu 56,7 bilhões de litros em 2019 (Renewable Fuels Association, 2020). Na safra de 2019/2020 a produção brasileira foi de 35,6 bilhões de litros, dos quais 34 bilhões foram oriundos de cana-de-açúcar e 1,6 bilhões de amido de milho (CNA, 2020). Nos Estados Unidos, cerca de 95% do etanol é produzido a partir do milho.

A produção do etanol requer a fermentação do açúcar, comumente feita pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A levedura não consegue fermentar o amido diretamente, portanto, uma etapa de hidrólise anterior à fermentação é necessária. O amido pode ser extraído do grão de milho por moagem úmida ou seca. Esses métodos de extração exigem equipamentos e processos distintos, e geram coprodutos diferentes em quantidade, valor nutricional e valor de mercado (Rausch e Belyea, 2006). O principal coproduto da produção de etanol por de moagem seca são os grãos de destilaria com solutos (GDS, *distillers grains with solubles*, em inglês). O principal coproduto do processamento por moagem úmida é o farelo de glúten de milho (Liu, 2011).

A moagem úmida do milho também é utilizada para produção de bebidas. Antes da fabricação de etanol combustível de milho, os coprodutos para alimentação animal vinham da fabricação de bebidas alcólicas (Loy e Lund, 2019) que são feitas normalmente com misturas

de grãos. Os coprodutos da produção de bebidas têm baixo valor de mercado comparado às bebidas e pouca importância na receita das fábricas. Por isso não há padronização no processo de produção dos coprodutos, que leva a variabilidade quanto a composição. Com o crescimento da indústria do etanol combustível, a disponibilidade e qualidade dos coprodutos de destilaria de milho para alimentação de ruminantes aumentou, bem como o interesse da pesquisa nesses alimentos (Robinson et al., 2008).

Devido a maior eficiência e economia energética na moagem seca (Kumar e Singh, 2019), cerca de 90% do etanol de milho é produzido nos Estados Unidos por esse processo (RFA, 2020). Os nutrientes restantes do grão após a extração do amido (proteínas, lipídeos, fibra, minerais e vitaminas) não se alteram significativamente pela fermentação, mas são concentrados. Esses nutrientes estarão presentes nos GDS.

Após a extração do amido, a produção do etanol de milho segue com a fluidificação, cozimento e liquefação do amido. A etapa seguinte é a quebra enzimática do amido à dextrinas por uma  $\alpha$ -amilase e das dextrinas à glicose por uma amiloglicosidase. Em seguida a levedura faz a fermentação da glicose, gerando um mosto com concentração de 14 a 20% de álcool. O álcool anidro é obtido da destilação desse mosto. O resíduo úmido obtido após a fermentação do mosto é centrifugado, evaporado e sofre extração do óleo, para dar origem aos GDS úmidos e secos (Kumar e Singh, 2019). O líquido residual após a centrifugação do mosto é chamado de “vinhaça fina”. Essa vinhaça sofre evaporação e condensação para formar os solutos condensados (a porção “S” do GDS), que contém as partículas mais finas do grão e as células da levedura. Os solutos condensados podem então ser secos junto com os grãos de destilaria ou adicionados ao coproduto úmido e assim comercializado (Stock et al., 1999). Na Figura 1 está representado o processo de produção do etanol de milho, GDS úmidos e secos por moagem seca.

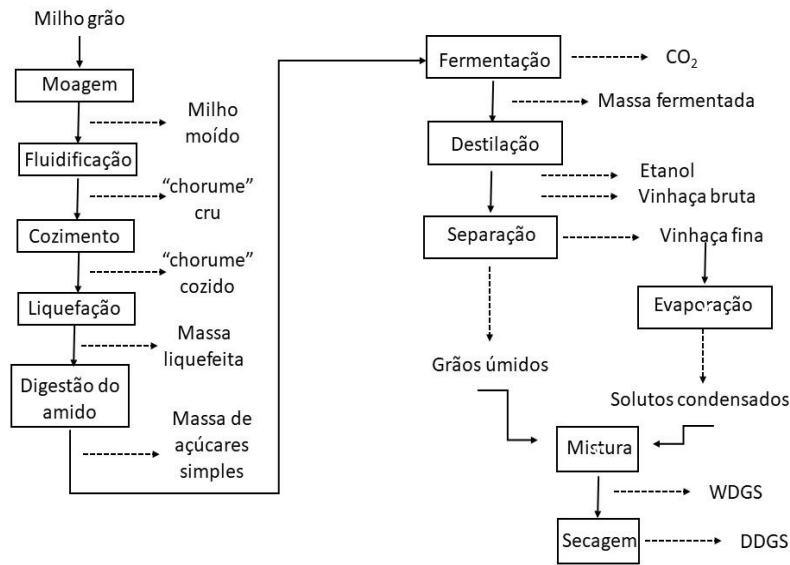


Figura 1. Diagrama esquemático da produção de etanol por moagem seca convencional. As caixas representam processos e as setas pontilhadas representam saída de intermediários e produtos. Adaptado de Liu (2011).

Os GDS podem ser comercializados úmidos (grãos de destilaria úmidos com solutos, em inglês chamados *wet distillers grains with solubles*) ou secos (grãos de destilaria secos com solutos, em inglês chamados de *dried distillers grains with solubles*). Os GDS secos são a principal forma de comercialização desse coproduto (Liu, 2011). Os solutos podem ser vendidos separadamente, na forma de xarope, porém restrito ao mercado local, devido ao baixo teor de matéria seca (Rausch e Belyea, 2006). Cem quilos de grão de milho produzem cerca de 40,2 L de etanol e 32,3 kg de GDS secos (Shingoethe, 2006). A produção de etanol nos Estados Unidos consumiu 187,5 toneladas de milho em 2019 e colocou no mercado 22,5 mil toneladas de GDS secos e 15,6 mil toneladas de GDS úmidos (RFA, 2020). Nos últimos 20 anos, houve aumento tanto na produção mundial de etanol quanto na disponibilidade de grãos de destilaria, o que acarretou o interesse em pesquisas aplicadas sobre seu uso na produção animal (Rosentrater, 2015).

O fracionamento do milho antes da fermentação foi incorporado ao processo de produção do etanol por moagem seca com o objetivo de aumentar a eficiência de conversão do amido em etanol e reduzir o gasto de energia na fábrica (Rausch e Belyea, 2006). A massa fermentável é composta de pericarpo, gérmen e endosperma, que contem fibra, amido, proteína e óleo. Apenas o amido produz o etanol, os outros componentes diluem a capacidade do fermentador. A retirada do gérmen do milho antes da fermentação, conhecida como *Quick*

*Germ*, além de aumentar a capacidade da fábrica permite a obtenção de um coproduto de alto valor agregado, o óleo de milho para consumo humano. Com objetivo semelhante, a fibra do pericarpo pode ser retirada antes da fermentação (*Quick Fiber*), desse processo pode ser extraído óleo do pericarpo, rico em fitoesteróis, que também possui alto valor agregado (Singh et al., 1999). A combinação dos processos *Quick Germ* e *Quick Fiber* antes da moagem a seco do milho permite obter o GDS secos com alto teor de proteína (geralmente acima de 45% de proteína bruta) chamado em inglês de *high protein dried distillers grain* (Berger e Singh, 2010).

A moagem enzimática (*E-Milling*) é outra modificação adotada na produção de etanol (Singh et al., 2005). Essa modificação envolve a hidratação e exposição do milho a enzimas proteases e amilases antes da retirada do gérmen e do pericarpo. Na moagem seca tradicional, os grãos são tratados com dióxido de enxofre antes do fracionamento e por isso os coprodutos desse processo são ricos em enxofre (Johnston et al., 2005). A moagem enzimática combinada com o *Quick Germ* e o *Quick Fiber* permite recuperar além do óleo do gérmen e da fibra do pericarpo, e a fibra do endosperma.

Singh et al. (2005) compararam a produção de etanol e GDS secos entre os processamentos *Quick Germ* apenas, *Quick Fiber* e *Germ* com a moagem enzimática, e a produção convencional por moagem seca. Esses autores produziram GDS secos com 28, 36, 49 e 58% de proteína bruta (PB) como percentual da matéria seca (MS) nos processos convencional, *Quick Germ*, *Quick Fiber* e *Germ* combinados e *E-Milling*, respectivamente. Os autores concluíram que as modificações no processo de moagem a seco permitiram maior eficiência na produção de etanol e a obtenção de GDS de maior valor nutricional.

Os GDS secos tradicionais normalmente têm alto teor de óleo de milho, oriundo do gérmen. A proporção de solutos condensados e de grãos de destilaria nos GDS pode variar de fábrica para fábrica e quanto maior a participação de solutos, maior será o teor de gordura dos GDS (Schingoethe et al., 2009). O óleo do milho se concentra nos solutos condensados, que tem 20% da MS como óleo (Wang et al., 2009). A retirada do óleo de milho dos solutos condensados é possível por combinação de processos químicos e físicos (uso de solventes, pH baixo, alta temperatura e centrifugação). O óleo retirado pode ser utilizado na produção de biodiesel e lubrificantes (Wang et al., 2009). Majoni et al. (2011) descrevem a retirada do óleo do milho dos solutos condensados após a destilação do etanol por centrifugação sob baixo pH e alta temperatura. Esses autores obtiveram 80% de recuperação do óleo de milho dos solutos condensados com essa técnica. A disponibilidade de GDS secos de baixo teor de óleo é benéfico à alimentação de vacas em lactação, visto que o óleo de milho é rico em ácidos graxos insaturados (78,2% do total de ácidos graxos; Abdelqader et al., 2009 b). O uso de GDS com

alto teor de óleo pode causar queda na gordura do leite (Leonardi et al., 2005; Abdelqader et al., 2009 b).

### 1.2.2 Proteínas do grão de milho

O grão de milho pode ser dividido em pedicelo, pericarpo, gérmen e endosperma. O pedicelo é uma pequena estrutura fibrosa que une o grão ao sabugo. O pericarpo é a camada fibrosa que envolve o endosperma e o embrião. O gérmen e o endosperma correspondem a 12% e 82% do peso do grão de milho seco, respectivamente (Shukla e Cheryan, 2001; US Grain Council, 2012). O gérmen é rico em lipídeos (35% do peso seco) e proteína (19% do peso seco), e pobre em amido (8% do peso seco). O endosperma contém (% do peso seco) 86% de amido e 9% de proteína. Aproximadamente 75% das proteínas do grão de milho estão no endosperma, o restante encontra-se no gérmen e em outros tecidos (Shukla e Cheryan, 2001). O grão de milho é considerado um alimento pobre em proteína, comparado às sementes de leguminosas. No entanto, quando é incluído em alta proporção na dieta animal ou quando seus coprodutos proteicos são utilizados, torna-se uma fonte de proteína importante.

As proteínas do milho podem ser classificadas de acordo com a solubilidade em: água (albuminas), solução salina 10% (globulinas), etanol 70% (prolaminas) e em ácido ou base (glutelinas). Esse método de fracionamento das proteínas do milho resulta em 40% das proteínas como prolaminas, 30% glutelinas, e 20% albuminas e globulinas (Kriz, 2009). As prolaminas são ricas em prolina, um aminoácido hidrofóbico, e têm baixa solubilidade em água e no fluido ruminal. Os cereais têm prolaminas específicas, tais como a gliadina no trigo e a kafirina no sorgo.

A prolamina do milho é chamada zeína. A zeína corresponde a cerca de 60% do total de proteína no grão de milho (Larkins, 2019). A zeína é pobre em lisina e triptofano. É considerada uma proteína de baixo valor biológico e desbalanceada em aminoácidos essenciais (Mitchell et al., 1952). Shukla e Cheryan (2001) descreveram os aminoácidos essenciais da zeína (em percentual de zeína): Arg 1,8%; His 1,1%; Ile: 6,2%; Leu: 19,3%; Lis não detectado; Met 2,41%; Phe 6,8%; Tre 2,7%; Trp 0,16%; Val 3,1%.

O grão de milho com maior teor de proteína está associado ao endosperma mais vítreo (Pratt et al., 1995). Dombrink-Kurtzman e Bietz (1993) estudaram nove híbridos de milho, e independente do genótipo, o endosperma vítreo foi duas a três vezes mais rico em zeína que o endosperma farináceo. A anatomia poligonal, compacta e firmemente aderida do endosperma vítreo do milho é conferida pelas zeínas, que se distribuem ao redor dos grânulos de amido. Landry et al. (2004) estudaram a composição da proteína do endosperma de genótipos de milho



de diferentes graus de vitreosidade. Estes autores descrevem o endosperma vítreo como sendo rico em zeínas e deficiente em nitrogênio não-proteico, comparado ao endosperma farináceo.

A zeína é composta de quatro subunidades:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . O endosperma vítreo tem maior proporção de  $\alpha$ -zeína e o endosperma farináceo tem mais  $\gamma$ -zeína (Dombrink-Kurtzman e Bietz, 1993). Paiva et al. (1991) estudaram a zeína de milho com alta lisina e concluíram que o gene para alta lisina em endosperma vítreo está associado a maior proporção de  $\gamma$ -zeína. Essas observações sugerem que a proporção de endosperma vítreo e a ocorrência de diferentes subunidades de zeína estão relacionadas.

As proteínas do gérmen do milho compõem aproximadamente 25% do total de proteínas do grão. No processo de moagem úmida do milho o gérmen pode ser removido e o óleo do gérmen separado para consumo humano ou animal. O produto resultante da extração do óleo do gérmen do milho é o farelo de gérmen de milho (Moreau et al., 2005).

Kelzer et al. (2010) descreveram o gérmen de milho desidratado (% da MS): 14,6% de PB; 30,3% de carboidratos não fibrosos; 30,1% de fibra em detergente neutro (FDN); 5,73% de cinzas e 17,7% de extrato etéreo. Nesse estudo os autores descreveram a PB do gérmen de milho composta por 40,5% de proteína solúvel, considerada totalmente degradável no rúmen. Almeida et al. (2011) descreveram a composição do farelo de gérmen de milho em aminoácidos (percentual da PB): 6,9% Arg; 2,9% His; 3,8% Ile; 7,9% Leu; 4,2% Lys; 1,6% Met; 4,7% Phe; 3,7% Thr; 1,1% Try; 6,0% Val. Como a zeína é pobre em lisina e as proteínas do gérmen ricas nesse aminoácido, praticamente toda a lisina de coprodutos proteicos de milho vem do gérmen do milho, que acaba diluída quanto menor for a inclusão de gérmen no coproduto.

### **1.2.3 Composição e valor nutricional de coprodutos do milho**

O milho pode ser processado na indústria do etanol por moagem úmida ou seca. O processo utilizado na indústria determina quais coprodutos serão produzidos e sua composição. A moagem úmida do milho difere da moagem seca por fracionar o grão e isolar o amido antes da fermentação. Após o umedecimento dos grãos e tratamento com dióxido de enxofre, é possível retirar o gérmen. O gérmen pode ser usado para extrair o óleo de gérmen de milho. Em seguida o pericarpo é separado e o endosperma é fracionado em glúten (rico em proteína) e amido (Heuzé et al., 2015 a). A moagem úmida é um processo industrial mais antigo que a moagem seca, e é empregada na fabricação de amido purificado, adoçantes, óleo de milho e bebidas alcoólicas (Rausch e Belyea, 2006), além da produção de etanol.

O farelo de glúten de milho fibroso e o farelo de glúten proteico são os principais coprodutos da moagem úmida usados para alimentação animal (Rausch et al., 2005), e serão

descritos brevemente. Os GDS, secos ou úmidos, são coprodutos da moagem a seco do milho serão descritos em detalhe adiante.

#### **1.2.4 Farelo de glúten de milho fibroso e farelo de glúten de milho proteico**

No mercado brasileiro o farelo de glúten de milho fibroso é conhecido pelos nomes de Promil (comercializado pela Cargill) e Refinazil (comercializado pela Ingredion). O farelo de glúten de milho fibroso contém o pericarpo do grão (em inglês chamado *bran*), solutos da maceração e fracionamento dos grãos e uma quantidade variável do gérmen do milho (Stock et al., 1999; Rausch et al., 2005). É comum o confundimento do farelo de glúten de milho fibroso com o farelo de glúten de milho proteico. A nomenclatura em inglês dos dois alimentos é muito semelhante. O farelo de glúten de milho fibroso é chamado *corn gluten feed*, enquanto o farelo de glúten de milho proteico é chamado *corn gluten meal*. Este último também advém da moagem úmida do milho, obtido após a etapa final de separação do endosperma em amido e glúten e secagem (Heuzé et al., 2015 a).

O farelo de glúten de milho fibroso pode ser vendido seco ou úmido (Corn Refiners Association, 2006). Na forma úmida, seu mercado é mais restrito, visto que é um produto perecível, com 6 a 10 dias de estocagem, mas pode ser conservado por ensilagem (Bowman e Paterson, 1988; US Grain Council, 2012).

O farelo de glúten de milho fibroso tem teor moderado de PB, de 21% (US Grain Council, 2012) a 23,8% da MS (NRC, 2001). Alguns autores citam de 18% a 23% de PB (Kelzer et al., 2010; Loy e Lund, 2019), e outros em torno de 25% de PB na MS (Rausch e Belyea, 2006). Anderson et al. (2012) descreveu o farelo de glúten de milho fibroso com 24,3% de PB; 42,7% de FDN e 2,70% de extrato etéreo na MS. É utilizado principalmente na alimentação de ruminantes (Rausch e Beleya, 2006).

O farelo de glúten de milho proteico é conhecido no mercado brasileiro como Protenose ou Glutenose 60 (produzido pela Cargill). O NRC 2001 traz a composição do farelo de glúten proteico (percentual da MS): 65% de PB; 11,1% de FDN e 2,5% de extrato etéreo. É um alimento com proteína de alta digestibilidade intestinal (Almeida et al., 2011), usado na produção de monogástricos como fonte de energia, proteína e pigmentos. Tem alto valor nutricional para aves e suínos e seu uso na alimentação de animais de companhia é comum (Santos, 2004; Rausch e Belyea, 2006).

#### **1.2.5 Gérmen de milho**

O gérmen do milho é separado no processo de moagem úmida após o umedecimento dos grãos e retirada do pericarpo. O gérmen do milho é prensado para obtenção do óleo, e o

material restante é o farelo de gérmen de milho. Sua composição bromatológica é (% da MS): 22,3% de PB, 13,1% de fibra bruta e 4,1% de extrato etéreo (Rausch e Belyea, 2006). Se o gérmen do milho não sofrer extração do óleo resultará no gérmen de milho integral, que tem elevado teor de extrato etéreo, de 46 a 60% da MS (Lima et al., 2012; Albuquerque et al., 2014). Esse alto teor de óleo agrega valor a esse coproduto (Johnston et al., 2005), usado principalmente em rações de monogástricos como ingrediente energético.

O gérmen de milho integral obtido na moagem úmida difere do gérmen de milho desidratado, obtido na moagem a seco com o fracionamento do grão antes da fermentação. O gérmen de milho desidratado tem menor teor de óleo e foi utilizado em dieta para vacas em lactação sem prejuízo na concentração e produção de gordura do leite, quando incluído em até 14% da MS da dieta (Abdelqader et al., 2009 a). O óleo extraído do gérmen de milho integral, oriundo da moagem úmida, pode ser usado para consumo humano, enquanto o óleo separado na moagem a seco não, é destinado a produção de biodiesel (Majoni et al., 2011).

As proteínas do endosperma do milho e do gérmen do milho têm composição em aminoácidos diferente. A proteína do endosperma irá se concentrar no farelo de glúten de milho. O farelo de gérmen irá concentrar a proteína do gérmen do milho. Para ilustrar a diferença em aminoácidos nos coprodutos do milho, a composição da proteína do farelo de glúten fibroso e do farelo do gérmen (Anderson et al., 2012) está resumida na Tabela 1:

Tabela 1. Aminoácidos essenciais (% da proteína bruta, PB) em farelo de glúten de milho fibroso e farelo de gérmen de milho (adaptado de Anderson et al., 2012)

<b>AA Essenciais, % PB</b>	<b>Farelo de glúten fibroso</b>	<b>Farelo de gérmen</b>
Arginina	4.65	3.59
Histidina	2.96	2.13
Isoleucina	2.88	4.27
Leucina	8.35	16.09
Lisina	2.76	2.10
Metionina	1.23	2.13
Fenilalanina	3.17	6.24
Treonina	3.21	3.20
Triptofano	0.53	0.36
Valina	4.57	4.80

A proteína do gérmen é mais rica em aminoácidos essenciais, com mais metionina, leucina, isoleucina, e fenilalanina comparada a proteína do endosperma. Isso leva a supor que quanto maior a proporção de gérmen no coproduto, melhor será sua qualidade proteica. Na moagem a seco tradicional para produção de etanol o grão não é fracionado antes da

fermentação, e a proporção de proteínas do endosperma e do gérmen pode variar entre coprodutos e entre fábricas (Rausch e Beleya, 2006).

Coprodutos da produção do etanol por moagem úmida são mais diversificados que os oriundos de moagem seca. Não há padronização quanto sua composição nutricional, e um coproduto identificado com a mesma denominação pode ter composição diversa. Por exemplo, o farelo de gérmen de milho pode ter composição semelhante ao farelo de glúten de milho proteico e por isso é comum confundi-los. O farelo de gérmen e o gérmen de milho integral também são facilmente confundidos, principalmente em literatura em que a língua original não é inglesa, pois tem-se que diferenciar as denominações *corn germ meal* de *corn germ* ou *full-fat maize germs* (Heuzé et al., 2015 b).

### **1.2.6 Grãos de destilaria com solutos**

Grãos de destilaria com solutos secos ou úmidos são o coproduto da produção de etanol de milho por moagem seca. Os GDS secos têm com base na MS: 29,7% de PB; 38,8% de FDN; 10,0% de extrato etéreo e 5,2% de cinzas (NRC, 2001). Anderson et al. (2012) descreveram a composição do GDS secos de seis diferentes fábricas norte-americanas e obtiveram em média (% da MS) 31,3% de PB; 11,4% de extrato etéreo, 41,9% de FDN e 4,6% de cinzas. Existe pouca diferença quanto ao teor de nutrientes entre os GDS secos e úmidos. O teor de extrato etéreo dos GDS acima de 10% da MS a princípio limita a inclusão desse coproduto para vacas em lactação. Os ácidos graxos presentes nos GDS secos e úmidos são predominantemente insaturados e podem causar redução no teor de gordura do leite (Morris et al., 2018).

Com o objetivo de caracterizar a variação dos GDS secos de diferentes plantas de produção de etanol, Spiehs e Shurson (2002) acompanharam a composição do produto de 10 fábricas norte-americanas. Os autores coletaram amostras de GDS secos a cada dois meses, por três anos, que foram submetidas a análise bromatológica, de aminoácidos e de minerais. A composição nutricional dos GDS secos de diferentes fábricas variou pouco, os autores argumentaram que o processo de fabricação de etanol no meio oeste americano é consistente. Em média os GDS secos tiveram 88,9% de MS, e em percentual da MS: 30,2% de PB; 44,5% de FDN e 10,9% de extrato etéreo. Os autores obtiveram a maior variação no teor de lisina e metionina dos GDS secos nas fábricas estudadas.

A tecnologia de produção de etanol de milho foi aprimorada nas últimas décadas, com o objetivo de aumentar o rendimento de etanol nas plantas de produção e de agregar valor aos coprodutos. Como consequência, os GDS também mudaram quanto a características nutricionais. Os GDS atuais, às vezes chamados na literatura de “nova geração”, tendem a ter

mais proteína e menos extrato etéreo que os GDS tradicionais (Schingoethe et al., 2009). Por exemplo, Majoni et al. (2011) descrevem a retirada do óleo do milho dos solutos condensados após a destilação do etanol, para uso na fabricação de biodiesel, o que permitiu a produção dos GDS secos de baixo teor de gordura (Berger e Singh, 2010). O uso de GDS secos de baixo teor de gordura na alimentação de vacas leiteiras é mais seguro quanto a queda na gordura do leite (Mjoun et al., 2010b; Castillo-Lopez et al., 2014).

O US Grain Council (2012) publicou a composição de vários coprodutos do etanol de milho de fábricas que usaram a moagem seca com fracionamento do grão antes da fermentação. A composição dos GDS secos e de outros coprodutos estão na Tabela 2. O objetivo é mostrar que a composição desses coprodutos varia entre fábricas, e que os GDS de “nova geração” não têm uma definição nutricional clara. Em geral, o GDS secos de alta proteína e de baixo teor de gordura têm mais proteína e fibra que os GDS secos tradicionais. O alto teor de fibra desses GDS secos torna seu conteúdo de energia inferior para alimentação de monogástricos. Os valores de fibra bruta foram incluídos apenas por curiosidade, visto que essa análise não é útil para ruminantes.

Robinson et al. (2008) avaliaram a composição nutricional de quatro diferentes coprodutos do etanol de milho produzidos por moagem seca: GDS secos convencionais, GDS secos oriundos de fermentação do amido sem prévio aquecimento, GDS secos de alta proteína e gérmen de milho desidratado. Os autores obtiveram dez amostras de cada alimento em três diferentes plantas de etanol americanas e as submeteram a análise bromatológica. Os GDS secos convencionais e de fermentação sem aquecimento tiveram composição semelhante, com média de 28% de PB; 31% de FDN e 11% de extrato etéreo. Os GDS secos de alta proteína tiveram 41% de PB; 23,0% de FDN e 5,3% de extrato etéreo.

Tabela 2. Composição de grãos de destilaria com solutos (GDS) secos oriundos de fábricas com tecnologia de fracionamento do milho para produção de etanol (Adaptado de US Grain Council, 2012)

Fábrica (1 a 8) e Produto	% da MN	% da MS			
	MS	Proteína bruta	Extrato Etéreo	Cinzas	Fibra Bruta
GDS secos tradicionais	89,3	30,9	10,7	6,0	7,2
1, GDS secos de alta proteína	91,6	44,8	3,9	2,1	7,3
1, <i>Bran</i> (farelo de pericarpo)	nd <sup>1</sup>	14,6	9,8	4,6	3,8
1, Gérmen de milho desidratado	93,2	16,9	18,9	5,8	5,5
2, GDS secos de alta proteína (técnicas <i>Quick germ</i> e <i>Quick fiber</i> )	nd	49,3	3,9	3,2	6,8
2, GDS secos de alta proteína (técnica <i>E-milling</i> )	nd	58,5	4,5	3,2	2,0
3, GDS secos de alta proteína	nd	35,0 - 37,0	4,0 - 6,0	nd	4,0 - 6,0
4, GDS secos de alta proteína	nd	40,0 - 50,0	2,5 - 4,0	nd	7,0 - 11,0
5, Gérmen integral	97,0	17,5	45,0	1,9	6,0
5, Farelo de pericarpo	90,0	9,5	2,0	1,0	16,6
5, GDS secos de alta proteína	90,0	45,0	3,3	4,0	3,8
5, GDS secos tradicionais	90,0	30,0	2,5	2,5	8,2
6, GDS secos tradicionais	nd	35,0 - 37,0	6,5	3,8	nd
7, GDS secos de baixa gordura	89,9	31,3	2,3	6,2	nd
8, Solutos condensados	93,4	21,6	4,7	8,3	3,1

<sup>1</sup>nd = não determinado.

A maior concentração de proteína nos GDS secos de alta proteína deve-se a retirada do pericarpo e do gérmen antes da fermentação. Além disso, a fermentação que gera esse tipo de produto é capaz de transformar mais amido do endosperma em etanol, o que concentra a proteína do endosperma. O gérmen retirado nesse processo dá origem ao gérmen de milho desidratado. Anderson et al. (2012) descreveram a composição de GDS secos de alta proteína vindos de três diferentes fábricas americanas (média das três fábricas, % da MS): 47,1% de PB; 42,2% de FDN; 4,7% de extrato etéreo e 1,7% de cinzas.

A variabilidade na composição dos GDS é um problema para seu uso na alimentação animal (Belyea et al. 1989). Os GDS variam entre fábricas não apenas quanto ao teor de PB, mas também quanto a digestibilidade e o teor de aminoácidos na proteína (Spiels et al., 2002; Kleinschimit et al., 2007). Liu (2011) cita possíveis causas de variação entre amostras de GDS secos: composição dos grãos, o processo de fabricação do etanol, eficiência da fermentação para produção do etanol, a quantidade de solutos adicionada aos grãos de destilaria e métodos analíticos. Já Shingoethe (2006) considera que o nível de inclusão de solutos não tem grande importância na composição dos GDS secos, a não ser pelo teor de fósforo, que aumenta com a inclusão de solutos.

As leveduras empregadas na produção do etanol não têm proteases e utilizam amônia como fonte de nitrogênio, suplementado na produção. O crescimento das células de levedura também contribui com a proteína do DDGS. Belyea et al. (2004) estimaram que 50% da proteína dos GDS secos seja de células de levedura, a partir da relação entre aminoácidos no milho, na levedura e nos GDS secos. Na Tabela 3 estão os dados de Belyea et al. (2004) de composição em aminoácidos essenciais da levedura, do milho e dos GDS secos.

É difícil determinar exatamente a contribuição das células de levedura para a proteína dos GDS, por falta de método para estimar a participação das leveduras. Em revisão sobre o valor proteico dos GDS Bottger e Sudekum, (2018) citam que a contribuição das células de levedura varia de 20 a 50% da PB dos GDS. Castillo-Lopez et al. (2013) usaram marcador de DNA para estimar em novilhos o fluxo para o duodeno de proteína oriunda de leveduras. Os animais foram alimentados com inclusão crescente de GDS secos. Nesse estudo foi estimado que novilhos consumindo dieta com 19,5% da MS como GDS secos ingeriram 29 g/d de proteína de levedura. A contribuição das leveduras a PDNR vinda dos GDS secos foi considerada pequena.

Em revisão sobre o valor nutricional de produtos de leveduras, Shurson (2018) descreve a massa de células de levedura com 46,5% de PB na MS e traz sua composição em

aminoácidos, incluída na Tabela 3. O teor de aminoácidos essenciais na PB de células de levedura é muito semelhante nas referências de Belyea et al. (2004) e Shurson (2018).

Tabela 3. Aminoácidos essenciais (% da proteína bruta, PB) na levedura, milho grão e grãos de destilaria com solutos (GDS). Adaptado de Belyea et al. (2004) e Shurson (2018)

<b>Aminoácido</b>	<b>Belyea et al. (2004)</b>			<b>Shurson (2018)</b>
	<b>Levedura</b>	<b>Milho</b>	<b>GDS</b>	<b>Levedura</b>
Arginina	4,70	6,00	3,54	4,43
Histidina	2,34	2,78	2,36	2,11
Isoleucina	4,74	4,33	5,12	4,28
Leucina	6,90	12,44	8,18	5,94
Lisina	6,64	2,67	2,59	6,13
Metionina	1,58	2,33	1,82	1,51
Fenilalanina	3,92	5,44	5,52	3,46
Treonina	4,54	4,33	3,40	4,32
Triptofano	1,10	1,00	0,64	1,05
Tirosina	3,20	4,78	2,56	-
Valina	5,04	5,67	5,49	4,73

Belyea et al. (2004) não obtiveram correlação significativa entre a composição do milho usado para fabricar o etanol e dos GDS secos em um estudo que durou cinco anos, em uma mesma fábrica. A composição do milho variou de um ano para outro, mas com pouco significado biológico. Por exemplo, em 1998 o teor de amido do milho foi significativamente menor, mas diferiu em apenas um ponto percentual em relação aos outros anos. A composição dos GDS secos variou de ano para ano, e dentre os nutrientes a PB foi o mais variável, de 28,3 a 33,3% da MS. Semelhante ao observado no milho, as variações foram pequenas e provavelmente sem grande significado nutricional, apesar dos autores argumentarem que teor de PB do DDGS tem grande importância comercial. A variação da PB dos GDS secos poderia ser explicada por diferenças no processo de fabricação. Por exemplo, a mistura dos grãos de destilaria e dos solutos não é um processo bem controlado e pode ser feito em proporções variadas, mesmo em uma única fábrica.

Em comparação ao milho, a proteína da levedura descrita no trabalho de Belyea et al. (2004) é deficiente em quase todos os aminoácidos essenciais, exceto pela lisina. Os GDS secos têm concentração de aminoácidos essenciais intermediária entre a levedura e o milho. Por ter PB mais alta (50% da MS) a levedura entrega mais aminoácidos em comparação ao milho por quilo de MS. A composição em aminoácidos dos GDS secos vai ser influenciada pela quantidade de levedura adicionada. O teor de lisina na proteína dos solutos é alto,



comparado ao milho e aos GDS. A lisina foi em média de 11,14% da MS de solutos de produção de etanol por moagem úmida, acompanhada por dois anos por Belyea et al. (1998).

As células de levedura se concentram nos solutos e quanto maior a quantidade de solutos nos GDS secos, maior a participação das células de levedura como fonte de proteína (Belyea et al., 1998). A inclusão de levedura nos GDS secos seria então benéfica para a composição final do produto em aminoácidos, pois melhoraria a baixa concentração de lisina na proteína do milho (Belyea et al., 2004). No entanto, é difícil prever a proporção de solutos e de grãos de destilaria que compõem os GDS secos de cada fábrica, ou a cada período, pois varia de lote para lote de GDS secos produzido (Belyea et al., 1998).

A composição da PB dos GDS secos em aminoácidos essenciais obtida por Spiehs e Shurson (2002) está na Tabela 4. Mais recentemente Anderson et al. (2012) descreveram a composição em aminoácidos de 20 coprodutos do milho de seis fábricas norte-americanas, incluindo os GDS secos. Os dados obtidos por Anderson et al. (2012) também estão na Tabela 4 para comparação com informação mais antiga, de Spiehs et al. (2002) e com o NRC (2001). Pouca diferença no teor de aminoácidos dos GDS secos pode ser observada entre as referências, exceto pelo teor de leucina e lisina na PB, menor no NRC (2001). O GDS secos de baixa gordura e o GDS secos de alta proteína têm aminoácidos essenciais na PB semelhantes ao GDS secos tradicionais.

Tabela 4. Composição da proteína bruta (PB) em aminoácidos essenciais (AAE) (% da PB) de grãos de milho, grãos de destilaria com solutos (GDS), GDS de baixa gordura (GDSBG) e GDS de alta proteína (GDSAP).

AAE, % PB	NCR 2001		Spiehs e Shurson (2002)	Anderson et al. (2012)		
	Milho	GDS	GDS	GDS	GDSBG	GDSAP
Arginina	4,61	4,06	3,97	4,63	4,15	3,95
Histidina	3,13	2,50	2,52	2,75	2,56	2,57
Isoleucina	3,31	3,71	3,71	3,74	3,60	4,04
Leucina	11,20	9,59	11,75	11,80	11,86	14,09
Lisina	2,84	2,24	2,81	3,74	2,88	2,93
Metionina	2,13	1,82	1,82	1,93	1,84	2,23
Fenilalanina	4,62	4,87	4,87	4,66	4,35	5,25
Treonina	3,55	3,44	3,74	3,75	3,63	3,57
Triptofano	0,72	0,87	0,83	0,68	0,52	0,43
Valina	4,02	4,70	4,97	4,86	5,07	5,12

Adaptado do NRC (2001), Spiehs e Shurson (2002) e Anderson et al. (2012)

Kleinschmit et al. (2007) estudaram a composição em aminoácidos de cinco GDS secos e um GDS úmido, comparados ao farelo de soja. Um GDS secos e os GDS úmidos vinham de uma mesma fábrica e dois GDS secos foram processados para ter qualidade

proteica superior. Os autores observaram que os GDS secos eram mais ricos em leucina e metionina e mais pobres em arginina e lisina comparados ao farelo de soja. O teor de lisina foi o mais variável entre os diferentes GDS secos, de 1,91% a 3,19% da PB. Os autores também obtiveram maior concentração de lisina nos GDS úmidos. Esse resultado é coerente com a maior susceptibilidade da lisina ao dano por aquecimento (Schwab, 1995). Schingoethe (1996) propôs uma classificação de alimentos proteicos baseada na concentração de aminoácidos essenciais em relação aos aminoácidos da caseína, chamada *milk protein score*. Segundo essa classificação, a proteína dos GDS secos tem maior escore que a proteína do farelo de soja (Kleinschmit et al., 2007), por fornecer mais metionina.

Ao longo das duas últimas décadas houve uma evolução nos grãos de destilaria, como por exemplo o fracionamento dos grãos antes da fermentação e a recuperação do óleo dos solutos condensados após a destilação do etanol (Berger e Singh, 2010; Rosentrater, 2015). Com o aprimoramento da técnica de produção de etanol de milho mais tipos de coprodutos surgiram. O teor de PB dos GDS em geral aumentou, e de extrato etéreo diminuiu. A composição em aminoácidos dos GDS mudou pouco. Em geral os GDS são um alimento muito variável, dependente de fatores que incluem a matéria prima e o processo de fabricação (Berger e Singh, 2010).

### **1.2.7 Degradação ruminal e digestibilidade da proteína de grãos de destilaria**

Na fabricação do etanol a eficiência de retirada do amido, quantidade de solutos adicionados aos grãos de destilaria e o processo de secagem podem afetar a composição e disponibilidade da proteína dos GDS secos. O processo de secagem dos GDS secos diminui a degradabilidade ruminal da proteína nesse alimento, mas o calor empregado também pode danificar as proteínas e torná-las indisponíveis para o animal (Kleinschmit et al., 2007).

Coprodutos proteicos do milho diferem quanto a degradabilidade da proteína e quanto à digestibilidade da PNDR (Firkins et al., 1984; Kleinschmit et al., 2007; Kelzer et al., 2010). O NRC (2001) traz parâmetros de digestão da proteína de farelo de glúten de milho, farelo de gérmen de milho e GDS secos, que estão resumidos na Tabela 5. O farelo de glúten de milho fibroso tem maior proporção da proteína como fração A (instantaneamente degradada no rúmen) e maior taxa fracional de degradação (kd) da fração B (potencialmente degradada no rúmen). Os GDS secos têm fração A intermediária e kd da fração B baixa, enquanto o farelo de glúten de milho proteico tem menor fração A, maior proporção da proteína como fração B e kd da fração B mais baixa. Como consequência, a PNDR calculada é maior para farelo de glúten de milho proteico, seguida dos GDS secos e menor para o farelo de glúten de milho

fibroso. A digestibilidade da PNDR é maior no farelo de glúten de milho proteico, intermediária no farelo de glúten de milho fibroso e menor nos GDS secos. No entanto, todos os alimentos têm digestibilidade da PNDR acima de 80%, que pode ser considerada alta. A proteína microbiana é considerada pelo NRC (2001) como 80% digestível, a título de comparação.

Os GDS são uma boa fonte de PNDR. Firkins et al. (1984) demonstraram isso em um estudo sobre o metabolismo do nitrogênio no rúmen de quatro coprodutos de milho: GDS secos, GDS úmidos, farelo de glúten de milho seco ou úmido. Os autores incubaram *in situ* os alimentos em quatro touros fistulados no rúmen, em saquinhos de nylon com 20 a 70 micrômetros de poro. Os alimentos foram incubados por 2, 4, 6, 8 e 96 h. A quantidade de N não-amoniaco ruminal dos alimentos foi determinada em ensaio com cinco touros com cânula duodenal. Os animais consumiram dieta de 13,5% de PB com GDS secos, GDS úmidos, farelo de glúten de milho seco ou úmido, comparado ao controle negativo que consumia somente ureia como N suplementar. A velocidade de degradação ruminal da proteína do GDS úmidos ou secos não diferiu entre eles, assim como do farelo de glúten úmido ou seco. O kd obtido foi de 3,90% / h para o GDS úmidos; 4,27% / h para o GDS secos e 9,97% / h para o farelo de soja. O fluxo duodenal de N-bacteriano foi maior com o GDS úmidos e com o farelo de glúten de milho seco, comparados aos GDS secos. O fluxo duodenal de N não-amoniaco total, no entanto, foi maior nos tratamentos com GDS úmidos e GDS secos, pois o fluxo de N não-amoniaco e não-bacteriano foi maior nesses tratamentos. O escape de proteína do rúmen com GDS úmidos e GDS secos foi de 47% e 54% do ingerido, respectivamente. O farelo de glúten de milho úmido ou seco teve escape de proteína para o duodeno inferior (26% e 14% do ingerido, respectivamente). Os autores atribuíram o maior escape de proteína para o duodeno à menor degradabilidade proteica do GDS úmidos e secos.

Nessa seção o objetivo é levantar dados da literatura sobre a descrição da degradabilidade e digestibilidade da proteína de coprodutos de etanol de milho. Foram buscados trabalhos que empregaram a incubação *in situ* para determinação da degradabilidade proteica e técnicas *in vitro* e *in situ* para determinação da digestibilidade da PNDR.

Tabela 5. Parâmetros de degradação proteica e digestibilidade (D) da proteína não degradada no rúmen (PNDR) de concentrados proteicos de milho segundo NRC 2001

<b>Alimento</b>	<b>Frações proteicas<sup>1</sup>, % PB</b>			<b>Taxa fracional de degradação</b>	<b>PNDR calculada<sup>2</sup>, % da PB</b>	<b>D PNDR</b>
	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>kd, % / h</b>		<b>%</b>
Farelo de glúten de milho fibroso	48,0	43,2	8,8	7,7	30,0	85
Farelo de glúten de milho proteico	3,9	90,9	5,2	2,3	74,6	92
Grãos de destilaria com solutos secos	28,5	63,3	8,2	3,6	50,8	80

<sup>1</sup>Fração A = instantaneamente degradada no rúmen; Fração B = potencialmente degradada no rúmen; Fração C = não degradada no rúmen.

<sup>2</sup>Proteína não degradável no rúmen calculada considerando animal consumindo dieta com 50% da matéria seca de forragem e consumo de 4% do peso vivo.

É necessário descrever os alimentos quanto a degradabilidade ruminal da proteína para avaliar dietas em sistema de proteína metabolizável (NRC, 2001). Pode-se citar a incubação *in situ*, degradação *in vitro* e mensuração dos produtos da degradação (Broderick et al., 1987) e a análise baseada do teor de nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA; Licitra et al., 1996) como principais métodos para determinar a degradabilidade da proteína no rúmen.

A técnica de incubação *in situ* é criticada principalmente por assumir que o desaparecimento de material do saquinho de incubação é igual a degradação ruminal. Proteínas solúveis são degradadas no rúmen a taxas variadas (Broderick et al., 1988) e, tanto a metodologia da incubação *in situ* quanto da mensuração de NIDA baseiam-se em solubilidade proteica. A técnica do NIDA é criticada por relatos de correlação baixa com a degradabilidade ruminal da proteína (Westreicher-Kristen et al., 2013) e porque foi demonstrado que o NIDA tem uma fração digestível (Weiss et al., 1989; Waters et al., 1992). Por ser uma técnica relativamente barata e de fácil execução, a mensuração da degradabilidade proteica *in situ* é possivelmente o método mais comum. Pela maior disponibilidade de dados, o NRC (2001) baseia-se em dados de incubação *in situ* para definir as frações proteicas e a taxa de degradação ruminal da proteína nos alimentos.

A sexta edição do NRC (1989) considerava a PNDR como tendo digestibilidade pós-ruminal fixa de 80%, ao passo que a edição de 2001 passou a descrever a digestibilidade pós-ruminal dos alimentos individualmente. Diferente do sistema britânico de exigências, que considera o NIDA como indigestível no trato total, o NRC (2001) optou por uma abordagem próxima do sistema francês, que usa dados de digestibilidade *in vivo* obtidos principalmente em ovinos. O uso do NIDA como indicador da digestibilidade pós-ruminal de proteína foi criticado, pois o calor usado na técnica alteraria a disponibilidade proteica. O NRC (2001) destaca a importância dos métodos *in vivo* com animais canulados no duodeno e íleo como padrão para mensuração de digestibilidade pós-ruminal, mas estes métodos são caros, trabalhosos e estão susceptíveis a erros relativos a marcadores e variação individual entre animais (Stern et al., 1997). Duas alternativas são as mais utilizadas: a técnica de saquinho móvel e mensuração *in vitro* (Calsamiglia e Stern, 1995). Galos cecotomizados foram usados com êxito como modelo animal para a digestão intestinal de aminoácidos para bovinos, mas não é apropriada para mensurar a digestibilidade do N, pois a excreta de aves contém ureia, mas não tem grandes quantidade de aminoácidos (Titgemeyer et al, 1990)

Em vários experimentos foi usada a incubação *in situ* para estimar a degradabilidade ruminal dos GDS (Firkins et al., 1984; Kleinschmit et al., 2006; Kleinschmit et al., 2007; Cao et al., 2009). Em alguns trabalhos foi usado o método *three step* descrito por Calsamiglia e

Stern (1995) para determinar *in vitro* a digestibilidade intestinal da proteína e de aminoácidos (Kleinschmit et al., 2007; Cao et al., 2009; Mjoun et al., 2010a; Westreicher-Kristen et al., 2013). Em outros, a incubação *in situ* em um único tempo e a técnica do saquinho móvel foi usada para determinar digestibilidade intestinal da PNDR (Kononoff et al., 2007; Janicek et al., 2008; Kelzer et al., 2010).

Assim como o teor de nutrientes dos GDS está sujeito a variação, a degradabilidade e a digestibilidade da proteína desse alimento também é influenciada pela matéria prima pelo processo de fabricação do etanol. A digestibilidade da proteína dos GDS é influenciada pelas etapas da fabricação que envolvem calor, antes da fermentação ou na secagem dos GDS secos (Bottger e Sudekum, 2018). O tipo de grão utilizado para a fabricação do etanol pode influenciar a digestibilidade da proteína dos GDS (De Boever et al., 2014).

Kleinschmit et al. (2007) objetivaram verificar se GDS secos de cinco fábricas diferentes e um GDS úmido diferiam entre si e do farelo de soja quanto as características de degradação ruminal e digestibilidade intestinal da proteína. Os autores incubaram amostras dos alimentos em duas vacas holandesas em lactação e determinaram a digestibilidade intestinal *in vitro* do resíduo de 12 h de incubação de acordo com o método de Calsamiglia e Stern (1995). Nesse estudo a fração B da proteína dos GDS secos variou de 63,0 a 80,7% da PB e seu kd de 1,9 a 4,1% / h. A concentração de PNDR calculada (considerando taxa de passagem de 6,8% / h) para os GDS secos foi de 60,3 a 71,7% da PB, superior à calculada para o farelo de soja, de 46,4%. A digestibilidade intestinal da PNDR dos GDS secos variou de 59,2 a 76,8%. Apesar da variação entre os GDS secos de diferentes fábricas, os autores os consideraram como semelhantes entre si. Os autores destacaram que os GDS úmidos tiveram maior degradabilidade ruminal efetiva (53,6% da PB) calculada considerando taxa de passagem (kp) de 6,8% / h, e menor proteína absorvível no intestino (35,5% da PB). Este dado corrobora com o fato de que o processo de secagem na fabricação dos GDS secos é importante para diminuir a degradabilidade ruminal do produto final (Shingoethe, 2006).

Foi avaliado também se GDS secos oriundos de diferentes fábricas poderiam interferir no desempenho de vacas em lactação e se a resposta no desempenho poderia ser atribuída a degradabilidade da proteína dos GDS (Kleinschmit et al., 2006). Com inclusão de 20% de GDS secos na MS da dieta os autores obtiveram aumento na produção de leite, independente da origem dos GDS secos. O escore de coloração de coprodutos de milho é considerada uma medida indireta de dano a proteína por calor excessivo (Rosentrater e Lehman, 2008; Cabrita et al., 2011), por estar relacionada ao teor de NIDA dos alimentos. No entanto, no trabalho de

Kleinschmit et al. (2006) os GDS secos estudados diferiram quanto ao escore de coloração e quanto a concentração de NIDA, mas não foi observada resposta no desempenho animal.

Na fabricação dos GDS secos a proporção de mistura com os solutos não é padronizada e esse não é um processo bem controlado. Depois da secagem, essa seria a segunda etapa crítica na fabricação dos GDS secos com impacto sobre a qualidade proteica do alimento. Cao et al. (2009) estudaram se o nível de inclusão de solutos poderia influenciar a digestão da proteína dos GDS no rúmen e no intestino. Os solutos condensados foram adicionados aos grãos de destilaria na proporção de 0:100; 13,3:86,7; 26,7:73,3; 40:60. Os autores prepararam as misturas e as mantiveram secas ou úmidas e incubaram em vacas fistuladas no rúmen por 3, 6, 12, 18, 24 ou 48 h. O resíduo de incubação por 12 h foi usado para determinar a digestibilidade da PNDR *in vitro*. Os autores observaram que os produtos secos tinham menor fração A e maior fração B da proteína comparado aos úmidos. A fração A também foi maior quanto maior a proporção de solutos condensados. O kd da fração B proteica não diferiu entre produtos secos ou úmidos, ou com a inclusão de solutos condensados. A PDR foi maior para produtos úmidos que para produtos secos, e maior com a participação de solutos na mistura. A digestibilidade estimada da PNDR diminuiu com a secagem dos produtos (64,0% vs. 69,7%,  $P < 0,01$ ), mas a estimativa de proteína absorvível no intestino foi maior nos produtos secos (39,7% vs. 32,7%,  $P < 0,01$ ), devido ao maior escape de proteína do rúmen. Curiosamente, em 48 h de incubação ruminal, a fração C indigestível foi próxima a zero em todas as combinações estudadas. Os autores concluíram que o processo de secagem afeta mais a digestão da proteína dos GDS que a proporção de solutos. A secagem disponibiliza mais proteína para digestão no intestino, mas ao mesmo tempo diminui a digestibilidade intestinal dessa proteína.

Alguns autores estudaram a digestão da proteína de GDS secos vindos da fabricação de etanol de diferentes grãos. Li et al. (2012) estudaram a degradabilidade e a digestibilidade de GDS secos de trigo e de milho. Esses autores usaram procedimento de incubação *in situ* e digestão *in vitro* para descrever a proteína dos GDS secos e compará-las aos grãos originais. A fração A da PB do GDS secos de trigo foi maior, e a fração C menor, comparado aos GDS secos de milho. Como efeito, a degradação ruminal efetiva da PB dos GDS secos de trigo foi maior comparada aos GDS secos de milho. De Boever et al. (2014) também trabalharam com GDS secos de milho e de trigo, incubados *in situ* no rúmen por 3, 8, 24, 48 e 336 horas. Os autores obtiveram kd da fração potencialmente degradável no rúmen de 4,69% / h para os GDS secos de trigo e kd de 2,23% / h para os GDS secos de milho. A proteína dos GDS secos de milho foi degradada mais lentamente no rúmen, comparado aos GDS secos de trigo.

Na Europa é comum que etanol seja produzido a partir de mistura de trigo, milho e cevada. Westreicher-Kristen et al. (2013) estimaram a PNDR dos GDS secos de milho entre 48,7 e 49,9% da PB, enquanto a PNDR de GDS secos de trigo variou de 19,2 a 56,0% da PB e de GDS secos de mistura de grãos entre 5,8 e 28,1% da PB (considerando resíduo da incubação *in situ* de 16 h). Em conjunto, os experimentos acima indicam que o tipo de grão utilizado na fabricação de etanol influencia a degradabilidade da proteína dos GDS secos.

A proteína do endosperma do milho é a zeína, e do trigo é a gliadina. As proteínas do endosperma do grão representam grande parte da proteína nos coprodutos do etanol. Assim, pode-se supor que a cinética de degradação da proteína dos coprodutos do etanol deve relacionar-se a composição proteica do endosperma dos grãos. Em estudo recente *in vitro*, foi demonstrado que os GDS secos oriundos de milho norte-americano tiveram maior digestibilidade da proteína comparados aos GDS secos de milho brasileiro (Palowski et al., 2021). Como a textura do endosperma do milho difere muito entre os cultivares norte-americanos e brasileiros (Corrêa et al., 2002), espera-se que a digestão dos coprodutos do etanol de milho também seja afetada.

Em comparação ao farelo de soja, os GDS têm menor degradabilidade proteica no rúmen. Alguns experimentos descrevem a incubação *in situ* de GDS e farelo de soja simultaneamente. Maxin et al. (2013) incubaram *in situ* quatro concentrados proteicos: farelo de soja, farelo de canola, GDS secos e GDS secos de alta proteína. Os GDS secos de alta proteína foram o alimento mais lentamente degradado no rúmen, e com menor fração A instantaneamente degradável. A degradabilidade ruminal efetiva da PB foi de 66,0% e 48,2% para o farelo de soja e os GDS secos de alta proteína, respectivamente (considerando  $k_p$  de 7,4%/h). A fração B da PB de farelo de soja teve  $k_d$  de 9,0% / h, enquanto a fração B dos GDS secos de alta proteína teve  $k_d$  de 5,4% / h.

Lee et al. (2016) compararam a degradabilidade proteica dos GDS secos tradicionais, GDS secos de alta proteína, GDS secos de trigo e farelo de soja. Os alimentos foram incubados *in situ* por 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 48 h. Os GDS secos de trigo tiveram maior fração A da proteína, seguido dos GDS secos tradicionais, farelo de soja e dos GDS secos de alta proteína. A fração proteica B foi maior no farelo de soja e não diferiu entre os tipos de GDS. Os GDS secos de alta proteína tiveram a maior fração proteica não degradável C (41,2% da PB), seguido dos GDS secos de milho, GDS secos de trigo e farelo de soja. O  $k_d$  da fração proteica B dos alimentos foi 17,6% / h no farelo de soja, 11,6% / h nos GDS secos de trigo, 4,9% / h nos GDS secos de milho e 3,9% / h nos GDS secos de alta proteína. O farelo de soja foi a fonte proteica mais degradável no rúmen (73,9% de degradação ruminal efetiva, assumindo taxa de passagem



de 6% / h), enquanto os GDS secos de alta proteína tiveram degradação ruminal efetiva de 28,6% apenas.

Mjoun et al. (2010a) estudaram concentrados proteicos de soja comparados com quatro tipos de GDS. Os autores compararam a degradabilidade ruminal e digestibilidade intestinal de GDS secos tradicionais, GDS úmidos, GDS secos de baixa gordura, e GDS secos de alta proteína com farelo de soja, farelo de soja extrusado e grãos de soja extrusados. Todos os GDS secos tiveram menor kd da fração B que o farelo de soja. Os GDS secos tiveram kd que variou de 2,7% / h (GDS secos de baixa gordura) a 4,3% / h (GDS secos de alta proteína). Os concentrados proteicos de soja tiveram kd que variou de 11,8% / h (farelo de soja) a 4,7% / h (farelo de soja extrusado). A PNDR média calculada dos GDS secos foi de 55,7% e das proteínas de soja foi de 44,6% (considerando kp de 6,17% / h).

Mjoun et al. (2010a) determinaram também a digestibilidade intestinal da PNDR e de aminoácidos das fontes proteicas. Os autores obtiveram 97,7% de digestibilidade para as proteínas de soja contra 92,4% para as proteínas de milho. Os autores calcularam a proteína potencialmente digerida e absorvida no intestino (PDAI) como PNDR x digestibilidade da PNDR. Os concentrados proteicos de milho tiveram maior PDAI que as proteínas de soja, por terem maior PNDR, apesar da digestibilidade intestinal um pouco mais baixa. Esses autores consideraram os concentrados proteicos de milho como boa fonte de aminoácidos digestíveis no intestino.

O coproduto com maior concentração de PB, os GDS secos de alta proteína, têm degradabilidade proteica semelhante aos GDS secos tradicionais (Mjoun et al., 2010a; Maxin et al., 2013; Lee et al., 2016). A substituição parcial de farelo de soja por GDS secos resultou em menor amônia no fluido ruminal e menor N-ureico no leite em ensaio com vacas em lactação (Kleinschmit et al., 2007), o que corrobora com a ideia de que a proteína dos GDS é degradada mais lentamente que da soja, mas também sugere que o uso de GDS pode contribuir para melhor perfil de aminoácidos absorvidos no intestino.

A substituição de farelo de soja por GDS secos pode ter impacto na forma de excreção de N por vacas em lactação. Por ser menos degradável no rúmen e menos digestível no intestino, o uso dos GDS secos pode levar a menor excreção de N via urina. Em um experimento de 11 semanas de duração, Lee et al. (2020) avaliaram a excreção de N em vacas em lactação alimentadas com farelo de soja ou GDS secos (28,8% da MS da dieta) como concentrado proteico. Os autores observaram menor excreção de N no esterco (fezes e urina somados) de animais alimentados com GDS secos, e maior proporção de N fecal que N urinário. Os autores atribuíram essa mudança na forma de excreção de N a menor PDR dos GDS secos em relação

ao farelo de soja, que também levou a menor N-ureico no plasma (Morris et al., 2018). O N excretado via fecal seria menos volátil e, portanto, com menor impacto ambiental que o N urinário.

Uma proposta para mensurar o teor e a digestibilidade da PNDR de alimentos é a incubação *in situ* em um único tempo, seguida de digestão no saquinho móvel (Kononoff et al., 2007). Essa técnica consiste na incubação ruminal do alimento por 16 h, seguida da colocação do resíduo em saquinho de nylon, inserido em cânula duodenal e recuperado nas fezes, para determinar a digestibilidade da PNDR. Kononoff et al., 2007 avaliaram por essa técnica farelo de soja, farelo de soja tratado com lignossulfato, caroço de algodão, farelo de glúten de milho e GDS secos. A PNDR de farelo de soja (28,4% da PB), dos GDS secos (43,0% da PB) e do farelo de glúten de milho (18,9% da PB) foi subestimada em comparação aos dados do NRC (2001). A digestibilidade intestinal da PNDR obtida por esse método foi de 98,5% no farelo de soja, 25,4% no farelo de glúten de milho e 86,1% nos GDS secos. Apesar dos autores considerarem a digestibilidade obtida semelhante aos dados da literatura, esses valores diferiram do NRC (2001) (PNDR 34,6% no farelo de soja, 50,8% nos GDS secos e 74,6% no farelo de glúten de milho; com 93%, 80% e 92% de digestibilidade respectivamente). A técnica do saquinho móvel pode ser questionada por não estimar o kd de cada fonte proteica e por não considerar o efeito da taxa de passagem sobre a PDR e PNDR dos alimentos, ou seja, assume que 16 h seria um tempo de retenção adequado para todos os alimentos no rúmen.

Janicek et al. (2008) utilizaram a incubação *in situ* por 16 h para descrever uma amostra de GDS secos. Esses autores fizeram um ensaio de desempenho e de metabolismo do N com vacas em lactação consumindo dieta em que os GDS secos substituíram parcialmente forragens, milho moído e proteína de soja, e totalmente o caroço de algodão. Foi mensurada a excreção de derivados de purinas para estimar a produção de proteína microbiana no rúmen. As vacas foram alimentadas com 0 ou 30% da MS de GDS secos. Os autores hipotetizaram que a inclusão dos GDS secos poderia permitir pH ruminal mais alto, e com isso aumentar produção de proteína microbiana no rúmen. Para caracterizar os GDS secos, estes foram incubados em comparação a farinha de sangue. A PNDR dos GDS secos foi inferior à da farinha de sangue (55,1% vs. 84,0% da PB), e a digestibilidade intestinal da PNDR dos GDS secos foi superior à farinha de sangue (91,0 % vs. 76,2 % da PNDR). Os autores não encontraram efeito dos GDS secos na excreção de derivados de purinas e produção estimada de proteína microbiana no rúmen.

Curiosamente, Janicek et al. (2008) escolheram a farinha de sangue e não a proteína de soja para comparar a digestibilidade da PNDR dos GDS secos. O objetivo dessa escolha não é claro, visto que na dieta do experimento de desempenho os autores substituíram farelo de soja

pelos GDS secos. Uma questão plausível nesse estudo seria que, dada a menor degradação ruminal da proteína dos GDS secos e sua alta inclusão na dieta, o suprimento de N para o rúmen poderia ficar limitado. No entanto, os autores não levantam essa hipótese. As dietas tinham elevado teor de PB na MS (19,5 e 18,1% da MS no controle e com GDS secos, respectivamente), o que pode ter levado os autores a não cogitar a limitação de N para o rúmen.

Kelzer et al. (2010) também utilizaram a incubação *in situ* em um tempo para estudar a digestibilidade de sete coprodutos de milho. Os autores trabalharam com farelo de gérmen de milho, GDS secos de alta proteína, GDS úmidos, farelo de glúten de milho úmido, farelo do pericarpo do milho e dois GDS secos vindos de fábricas distintas. Os GDS secos 1 vinham de um processo de fabricação sem aquecimento antes da fermentação, e os GDS secos 2 vinham de um processo com o cozimento antes da fermentação. As frações proteicas foram descritas segundo Licitra et al. (1996). Os GDS secos e os GDS secos de alta proteína tiveram o maior teor de PNDR (56,3 e 55,2% da PB, respectivamente), e os alimentos de menor PNDR foram o gérmen de milho e o farelo de glúten de milho úmido (16,5% e 11,5% da PB, respectivamente). A digestibilidade intestinal da PNDR de todos os alimentos estudados foi alta, acima de 90%, com exceção do farelo de pericarpo de milho (65,8%).

Kelzer et al. (2010) descreveram ainda a composição em aminoácidos da PNDR dos alimentos. Os autores consideraram a análise de aminoácidos do resíduo da incubação por 16 h. A concentração de aminoácidos essenciais no resíduo foi semelhante ao alimento original. Nos GDS secos tradicionais e de alta proteína a concentração de metionina e leucina elevaram-se no resíduo após a incubação, em comparação ao alimento original. A concentração de histidina e valina também foram maiores após a incubação, mas em menor magnitude.

Os modelos nutricionais atuais consideram a composição da PNDR em aminoácidos como igual ao alimento original e a digestibilidade intestinal constante para todos os aminoácidos na PNDR (NRC, 2001). Apesar de Kelzer et al. (2010) mostrarem que esse conceito faz sentido para coprodutos de etanol de milho, outros autores têm questionado a composição em aminoácidos da PNDR nos GDS. Maxin et al. (2013) estudaram a degradabilidade ruminal de aminoácidos isoladamente em quatro concentrados proteicos e observaram que nos GDS secos e GDS secos de alta proteína, a alanina, leucina e metionina foram os aminoácidos menos degradados no rúmen. Westreicher-Kristen et al. (2013) obtiveram resultado semelhante, com maior teor de leucina e metionina em resíduo de GDS secos após incubação *in situ* por 16 h. Esses trabalhos suportam a ideia de que GDS secos de milho podem ser fonte de PNDR rica em metionina e leucina.

Lisina e metionina são considerados os primeiros aminoácidos limitantes para vacas em lactação. Por essa perspectiva, pode-se considerar que fontes proteicas vindas de milho e de soja são complementares (Annexstad et al., 1986; Lobos et al., 2021). Mjoun et al. (2010a) estimaram que a lisina absorvível no intestino na PNDR de farelo de soja foi de 8,9 g/kg de PB e a metionina foi de 2,5 g/kg de PB. A lisina absorvível vinda da PNDR de GDS secos de alta proteína foi 7,8 g/kg de PB e a metionina de 10,0 g/kg de PB. Os GDS secos também podem ser fonte de aminoácidos ramificados digestíveis no intestino delgado. Para os GDS secos de alta proteína foi estimado suprimento no intestino de 64,0 g/kg de PB de leucina, 17,7 g/kg de PB de isoleucina e 19,3 g/kg de PB de valina.

Os GDS secos são uma boa fonte de PNDR, ainda que muito variáveis quanto a qualidade proteica. Têm perfil de aminoácidos complementar ao farelo de soja, considerando o conceito que lisina e metionina são os dois primeiros aminoácidos limitantes para a produção de leite. Se adotada a visão mais moderna de que aminoácidos essenciais têm função estimuladora da síntese proteica na glândula mamária, os GDS podem ser uma fonte proteica ainda mais útil para a formulação, por suprir além da metionina, aminoácidos ramificados.

### **1.2.8 Palatabilidade e digestibilidade de alimentos contendo leveduras:**

A preferência ou rejeição de alimentos ricos em leveduras parece ser dependente da espécie animal e do tipo de produto utilizado. A adição de leveduras com o objetivo de aumentar a aceitação da dieta pelos animais é mais comum na produção de monogástricos e na alimentação de animais de companhia.

Produtos contendo levedura são utilizados com sucesso em dietas para cães, mas sua efetividade varia com a preparação contendo levedura utilizada. Levedura de cervejaria é um dos produtos mais efetivos como palatilizante para cães. Grãos de destilaria oriundos da produção de etanol combustível, no entanto, causaram rejeição da dieta quando incluído em ração para cães (Beynen, 2019). Levedura de cana-de-açúcar utilizada como aditivo na alimentação de gatos causou rejeição da dieta, quando incluída na proporção de 2% da matéria natural na dieta controle (Lima et al., 2016).

Produtos à base de levedura são utilizados como palatilizante na aquacultura. Camarões são descritos como seletivos e lentos ao consumir a ração, e por isso condicionantes na dieta têm importância. Palatilizantes vindos de farinhas animais têm qualidade variável e podem ser substituídos com sucesso por palatilizantes a base de leveduras (Morais e Derby, 2019). Levedura de cervejaria foi utilizada como fonte proteica em dieta para camarões, em

substituição ao farelo de soja e a farinha de peixe, sem prejuízo no desempenho (Guo et al., 2018).

Há pouca informação na literatura sobre palatabilidade de produtos contendo leveduras para ruminantes. Grãos de destilaria com solutos úmidos melhoraram a palatabilidade de dieta com forragens de baixa qualidade ou muito secas, para bovinos em terminação (Benton et al., 2007). A quantidade de levedura ou produtos de levedura de fato nos GDS úmidos é difícil de determinar e provavelmente varia de fábrica para fábrica. É provável que quanto maior a inclusão de solutos nos GDS, maior a participação de produtos de levedura. No caso do uso de GDS úmidos em dieta com forragens secas, não é possível determinar se o aumento da aceitação da dieta pelos animais se deve ao efeito palatilizante dos GDS ou à umidade da dieta.

Em um teste de preferência por vacas Jersey em lactação, os GDS secos foram consumidos mais rápido que milho grão moído, farinha de penas, e um *blend* contendo os três alimentos (Hill, 2021). A oito vacas Jersey individualizadas em *tie stall* e a elas oferecido aleatoriamente 1,13 kg de GDS secos, farinha de penas, milho moído ou uma mistura dos três alimentos. Os animais tiveram acesso aos alimentos teste por uma hora. A preferência foi determinada pelo alimento totalmente consumido primeiro ou pela pesagem da sobra do alimento após uma hora de teste. Os GDS secos foram o alimento com maior índice de preferência, seguido do milho moído, da mistura de alimentos e por último a farinha de penas. Esse resultado indica que os GDS secos têm alta palatabilidade para vacas em lactação.

A digestibilidade de alimentos ricos em leveduras poderia ser prejudicada por seu alto teor de bases nitrogenadas e pela parede celular, que quando intacta pode dificultar o acesso enzimático ao conteúdo celular. A digestibilidade aparente de células íntegras ou rompidas de *Saccharomyces cerevisiae*, mensurada em ratos, foi de 82,6 e 85,3% respectivamente, sem diferença entre as preparações (Caballero-Cordoba, 1997). No mesmo estudo a digestibilidade aparente em ratos da caseína foi de 92,1%. Em estudo com leitões em crescimento Spark et al. (2005) substituiu 60% do farelo de soja da dieta por levedura de cerveja (com 47,3% de PB na matéria natural) e não observou efeito no consumo de alimento ou desempenho. A digestibilidade aparente do N oriundo da levedura nos leitões foi de 87,2%; a digestibilidade aparente da dieta foi de 86,5% para a levedura e 86,7% para a dieta com farelo de soja.

Pelos dados citados acima espera-se a palatabilidade de produtos ricos em leveduras seja alta, ou pelo menos tão alta quanto milho grã moído para vacas em lactação. Espera-se também que a digestibilidade intestinal de produtos ricos em levedura não seja limitante tanto para a produção de monogástricos quanto de ruminantes.

### **1.2.9 Uso de coprodutos do milho na alimentação de vacas em lactação e desempenho leiteiro**

Muitos experimentos de desempenho na lactação trazem resultados satisfatórios com o uso de GDS secos ou úmidos, sem perda de produção de leite e sólidos, ou com aumento da produção (Kleinschmit et al., 2006; Janicek et al., 2008; Hubbard et al., 2010; Mjoun et al., 2010b; Benchaar et al., 2013). O teor de PB, a digestibilidade, e a composição em aminoácidos da proteína desse alimento são determinantes do desempenho. A concentração de gorduras e ácidos graxos dos coprodutos do milho também tem grande importância prática. Coprodutos ricos em óleo do milho em dieta de vacas em lactação podem induzir queda na gordura do leite (Leonardi et al., 2005). Nos próximos subtópicos objetiva-se exemplificar a relação da composição e da digestibilidade dos coprodutos proteicos de milho com o desempenho de vacas em lactação, com foco em resultados com grãos de destilaria.

### **1.2.10 Uso de grãos de destilaria secos ou úmidos e desempenho na lactação**

Os GDS úmidos têm degradação ruminal da proteína mais rápida e fornecem menos PNDR comparado aos GDS secos (Kleinschmit et al., 2007; Kelzer et al., 2010). Por outro lado, o uso de GDS secos processados sob aquecimento excessivo, pode resultar em perda de produção de leite (Powers et al., 1995) por indisponibilização da proteína pelo calor.

As vantagens do uso dos GDS secos em relação aos GDS úmidos para alimentação animal são a facilidade de estocagem e maior a eficiência de transporte. Os GDS úmidos deterioram e perdem palatabilidade em 5 a 7 dias, dependendo das condições ambientais. Em clima quente a deterioração é mais rápida (Shingoethe, 2006). A ensilagem é uma alternativa viável de conservação dos GDS úmidos. Apesar do alto teor de proteína do GDS úmidos, esse alimento atingiu pH de 3,97 após 14 dias de ensilagem (Anderson et al., 2015). A inclusão de 20% da MS de GDS úmidos ensilado para vacas em lactação não afetou a produção de leite corrigido para energia em comparação com GDS secos (Ranathunga et al., 2017).

Al-Suwaiegh et al. (2002) utilizaram GDS úmidos ou GDS secos de milho e de sorgo para vacas em lactação, incluídos em 15% da MS da dieta. Nesse experimento não houve uma dieta sem grãos de destilaria, o objetivo era comparar os tipos de grãos de destilaria. As dietas não tiveram efeito sobre o desempenho na lactação ou sobre o perfil de fermentação ruminal. Os autores concluíram que, na inclusão de 15% da MS da dieta, os GDS úmidos e os GDS secos são comparáveis e suportam a mesma produção de leite.

Em um ensaio com substituição total de farelo de soja e parcial de milho grão por GDS úmidos, Birkelo et al. (2004) observaram redução no consumo de alimento sem alteração na produção de leite. Os autores consideraram que vacas que consumiram GDS úmidos tiveram menor partição de energia para ganho de peso que vacas na dieta controle, que explicou o ganho em eficiência. A avaliação de ganho de peso nesse experimento poderia ser questionada, por ser um estudo em reversão de tratamentos (períodos de 5 semanas de duração). Além disso, a dieta com GDS úmidos teve maior teor de PB e extrato etéreo que a controle. A maior inclusão de gordura na dieta, vinda dos GDS úmidos, poderia explicar a queda de consumo. O principal objetivo desse trabalho foi avaliar os GDS úmidos como alimento energético, foi mensurada a perda de energia como metano, que foi menor na dieta com os GDS úmidos e pode explicar o aumento de eficiência energética nessa dieta. Foi observada também queda no teor de proteína do leite, o que pode ser relacionado a substituição parcial do milho grão por GDS úmidos.

Anderson et al. (2006) compararam farelo de soja com GDS secos ou úmidos, incluídos em 10 ou 20% da MS da dieta, em substituição parcial do milho moído e do farelo de soja. As dietas com grãos de destilaria suportaram maior produção de leite (39,8 kg/d vs. 42,3 kg/d,  $P = 0,02$ ). O uso de GDS secos ou úmidos não interferiu no consumo de MS e produção de leite, mas a produção de gordura e proteína do leite foi maior nas dietas com GDS úmidos. Nesse trabalho, a dieta com GDS úmidos levaram a maior concentração de N-ureico no leite, o que era esperado. Em comparação ao farelo de soja, os animais que consumiram GDS tiveram maior produção de gordura (1,28 kg/d vs. 1,40 kg/d,  $P = 0,04$ ) e proteína do leite (1,20 vs. 1,28 kg/d,  $P = 0,01$ ). A dose dos GDS de 10 ou 20% na MS teve menor efeito sobre a produção, apenas com tendência de maior produção de proteína do leite com 20% de GDS na MS. No entanto, as dietas nesse estudo não foram isoproteicas, com a concentração de PB crescente com a inclusão dos GDS (16,3% a 17,6% de PB na MS nas dietas com proteína de milho e 16,8% na MS na dieta controle).

Weiss (2019) observou queda no desempenho, com redução da produção de leite, gordura e proteína, em dieta com alta inclusão de GDS úmidos. A dieta experimental continha 44% da MS como GDS úmidos. A produção de leite caiu 2,3 kg/d ( $P < 0,01$ ) e não foi recuperada com a inclusão de 70 g/d de lisina e 14 g/d de metionina metabolizáveis, em forma de aminoácidos protegidos. As dietas foram isoenergéticas, mas a dieta com os GDS úmidos tinha aproximadamente 10% menos amido na MS. Os autores atribuíram a queda da produção a maior degradabilidade da proteína da dieta com GDS úmidos e a possível deficiência de outros aminoácidos, além de lisina e metionina.

Em conjunto, os trabalhos de Al-Suwaiegh et al. (2002), Birkelo et al. (2004) e Anderson et al. (2006) mostram que quando incluídos até 20% da MS na dieta de vacas em lactação, GDS úmidos ou secos parecem suportar desempenho na lactação semelhante. O trabalho de Weiss (2019) mostra que em inclusão alta, os GDS úmidos prejudicam o desempenho. Além disso, o trabalho de Weiss (2019) aponta que outros aminoácidos além de lisina e metionina podem ser importantes para produção de leite em dieta com GDS úmidos.

### **1.2.11 Importância da qualidade proteica dos grãos de destilaria no desempenho leiteiro**

O teor de PB dos GDS é importante comercialmente e nutricionalmente. Há poucos experimentos com GDS secos de alta proteína para vacas em lactação. Christen et al. (2010) comparou o desempenho de vacas em lactação alimentadas com GDS secos de alta proteína (44,5% de PB na MS), farelo de soja, farelo de canola ou GDS secos convencionais (29,8% de PB na MS). Esses autores substituíram todo farelo de soja das dietas pelos concentrados proteicos testados. A inclusão dos concentrados proteicos foi de 11% da MS para o farelo de soja, 12% da MS para os GDS secos de alta proteína, 12,7% da MS para o farelo de canola e 21,2% da MS de GDS secos. As dietas foram isoproteicas (15 a 15,6% de PB na MS) e o teor de FDN variou de 27,4 a 31,1% da MS. O teor de amido das dietas não foi relatado. Os autores não observaram diferença em consumo, produção de leite (31,8 kg/d,  $P = 0,63$ ) ou produção de sólidos (1,05 kg/d de proteína e 1,29 kg/d de gordura;  $P > 0,53$ ). O percentual de gordura do leite foi mais alto nas dietas com farelo de soja e GDS secos de alta proteína, e mais baixo com GDS secos. O percentual de proteína do leite foi reduzido na dieta com GDS secos, e não diferiu entre as outras fontes proteicas. A secreção de N no leite como caseína foi maior para a dieta com GDS secos de alta proteína. Segundo predição do NRC (2001) as dietas com GDS secos convencionais e de alta proteína tiveram menor PDR (10,8%) e maior PNDR (5,8%) em comparação às demais (11% e 5% de PDR e PNDR). Os autores não discutem a degradabilidade das fontes proteicas.

No estudo de Christen et al. (2010) foi mensurada também a concentração de aminoácidos no plasma e a eficiência de extração de aminoácidos pela glândula mamária. A concentração de metionina no plasma foi maior para as dietas com GDS secos convencionais e de alta proteína, e menor na dieta com farelo de soja, enquanto a lisina plasmática foi maior na dieta com farelo de soja. A concentração de leucina e fenilalanina plasmática foi maior na dieta com GDS secos de alta proteína, em comparação ao farelo de soja e ao farelo de canola. A extração de aminoácidos pela glândula mamária mostrou que a metionina foi o primeiro



aminoácido limitante na dieta de farelo de soja e a lisina foi o primeiro limitante nas dietas com GDS. Leucina, triptofano e valina foram menos limitantes na dieta com GDS secos de alta proteína. Os autores consideraram a dieta com GDS secos de alta proteína como o melhor balanço de aminoácidos essenciais, visto que a dieta com esse alimento resultou em maior proporção de proteína verdadeira e de caseína no leite. Os autores concluíram que GDS secos de alta proteína são uma fonte proteica comparável ao farelo de soja e farelo de canola.

Os resultados de Christen et al. (2010) estão em concordância com de Kleinschmidt et al. (2006) que trabalharam com três fontes de GDS secos para vacas em lactação. Esses autores utilizaram doze vacas em um experimento quadrado latino 4 x 4, com uma dieta controle e três com GDS secos de três diferentes fábricas. As dietas continham 20% da MS como GDS secos, em substituição a 9,3% de milho e 10,7% de farelo de soja. Vacas nas dietas com GDS secos tiveram produção de leite superior ao controle (+ 3,4 kg/d;  $P = 0,007$ ) e maior produção de gordura no leite (+ 0,116 kg/d;  $P = 0,02$ ). Os GDS secos das diferentes fábricas foram semelhantes entre si, com teor de PB em médio de 30,5% e extrato etéreo de 10,6%. Esses autores também observaram concentração plasmática de lisina inferior nos animais alimentados com os GDS secos, em comparação aos na dieta com farelo de soja. Por outro lado, a concentração de leucina e histidina nos animais tratados com GDS secos foi superior. Esses dados em conjunto sugerem que a disponibilidade de aminoácidos essenciais varia pouco entre GDS secos tradicionais ou de alta proteína. Assim, a composição em aminoácidos e sua digestibilidade não são alteradas, apenas a proteína se concentra nos GDS secos de alta proteína.

Hubbard et al. (2010) trabalharam com GDS secos de alta proteína (46,1% de PB na MS) em substituição ao farelo de soja e ao farelo de soja tratado com lignossulfato em dietas de vacas em lactação. Os autores incluíram 20% da MS da dieta como GDS secos de alta proteína, em substituição total aos concentrados de soja da dieta (9,7% da MS de farelo de soja e 5,6% da MS de farelo de soja tratado com lignossulfato). A produção de leite, gordura e proteína foram maiores na dieta com GDS secos de alta proteína (33,4 vs. 31,6 kg/d; 1,35 vs. 1,21 kg/d e 1,0 vs. 0,95 kg/d; respectivamente;  $P \leq 0,05$ ). Esse estudo não teve ensaio de digestibilidade ou outras análises. Os autores atribuíram a resposta apenas a maior densidade energética da dieta com GDS secos de alta proteína, que continha 2,5% da MS de extrato etéreo a mais que o controle.

Em estudo mais recente, os GDS secos de alta proteína (56% de PB na MS) foram testados para vacas em lactação em substituição a proteína de soja e de canola (Brown e Bradford, 2020). Foram utilizadas 24 vacas em lactação em quadrado latino 4 x 4 com períodos de 28 dias. As dietas tinham como concentrado proteico: farelo de soja apenas (SB), GDS secos

de alta proteína, farelo de soja de alta PNDR (SBBP) e farelo de canola com farelo de soja de alta PNDR (CABP). As dietas foram isoproteicas (16,8 % de PB na MS), e os tratamentos SBBP e CABP foram formulados para igualar ao teor de PNDR dos GDS secos (6,8% da MS). As dietas continham lisina protegida e precursor de metionina para manter o fornecimento de lisina e metionina metabolizável. A dieta com os GDS secos de alta proteína causou redução no consumo de MS (27,3 kg/d vs. 28,5 kg/d em média nos tratamentos SBBP e CABP;  $P < 0,01$ ) e da produção de leite (37,4 kg/d vs. 41,3 kg/d em média nos outros tratamentos;  $P < 0,01$ ). O tratamento SB teve produção intermediária e SBBP e CABP tiveram a maior produção. A dieta com GDS secos de alta proteína também causou redução do teor e produção de proteína no leite. Os autores atribuíram a queda no desempenho ao menor consumo e a menor digestibilidade da proteína dos GDS secos de alta proteína, visto que elevou a excreção fecal de nitrogênio.

Os GDS secos de alta proteína utilizados no estudo de Brown e Bradford (2020) tinham coloração escura, indício de dano à proteína por aquecimento excessivo. Existe um risco em substituir todo o concentrado proteico na dieta por coprodutos de milho, não apenas relativo ao desbalanço de aminoácidos, mas também à disponibilidade da proteína. O resultado de Brown e Bradford (2020) foi oposto ao de Hubbard et al. (2010), ambos com substituição total de proteína de soja por GDS secos de alta proteína. Hubbard et al. (2010) realizaram um ensaio de degradação ruminal da proteína do GDS secos e obtiveram 62% de PNDR, mas infelizmente não comentam a digestibilidade dessa PNDR. A comparação dos resultados desses dois estudos mostra a importância da digestibilidade da PNDR no desempenho na lactação.

A maioria dos trabalhos sobre o uso de GDS secos para vacas em lactação são experimentos de reversão de tratamentos. Há crítica na literatura quanto a estudos de curta duração e de reversão para mensurar o impacto de fontes proteicas no desempenho de vacas em lactação (Zanton, 2016). Hristov e Giallongo (2014) sugerem que o *pool* de aminoácidos no corpo do animal pode ser mobilizado e compensar deficiências de curto prazo, logo estudos longos seriam necessários para estabelecer corretamente a resposta a fontes proteicas. Morris et al. (2018) conduziram estudo de 11 semanas de comparação com GDS secos de baixo teor de extrato etéreo. Esses autores encontraram redução na produção de leite e sólidos com a inclusão de 28,8% da MS como GDS secos. Os GDS secos foram incluídos na dieta em substituição total ao farelo de soja. A concentração de alguns AA essenciais no plasma das vacas na dieta experimental foi menor (arginina, isoleucina, leucina, lisina, treonina;  $P < 0,05$ ). A menor disponibilidade desses AA pode explicar a queda na produção de proteína do leite.

Há relato de aumento de produção de leite e sólidos do leite com substituição parcial do farelo de soja por GDS secos (Kleinschimit et al., 2006). Por outro lado, queda em desempenho leiteiro é comumente relatada com substituição total do farelo de soja por GDS secos (Morris et al., 2018; Brown e Bradford, 2020; Lobos et al., 2021). Em dois estudos revisados, a substituição total do farelo de soja por GDS secos resultou em aumento de produção de leite (Hubbard et al., 2010; Benchaar et al., 2013). A estratégia de combinar proteína de soja e os GDS secos tradicionais ou de alta proteína parece ter sido ainda pouco explorada.

Em dietas com GDS secos, a lisina é frequentemente apontada como aminoácido limitante (Nichols et al., 1998; Liu et al., 2000, Paz e Kononoff, 2014). Kleinschimit et al. (2006) compararam três GDS secos de fábricas diferentes e observaram que aquele com sinais de dano à proteína por calor resultou em menor concentração plasmática de lisina. A degradabilidade ruminal da proteína dos GDS secos diminuiu com o aquecimento (Cao et al., 2009), aumentando a PNDR do alimento. O aminoácido mais sensível ao dano por aquecimento é a lisina (Shwab et al., 1995). Os GDS secos possuem menor teor de lisina em sua composição, e o dano por aquecimento excessivo pode torná-los ainda mais pobres nesse aminoácido.

Nichols et al. (1998) avaliaram quatro dietas diferindo quanto a suplementação proteica: farelo de soja apenas, farelo de soja com lisina e metionina protegidas, GDS secos apenas, GDS secos com lisina e metionina protegidas. Os aminoácidos protegidos foram fornecidos sobre a dieta (*top dress*). Vacas que consumiram os GDS secos tiveram produção de leite mais alta comparado ao farelo de soja, e produziram ainda mais quando suplementadas com aminoácidos (34,3 kg/d com farelo de soja, 35,3 kg/d com GDS secos e 36,7 kg/d com GDS secos e aminoácidos). O teor de proteína e de gordura do leite não responderam aos tratamentos. Vacas consumindo GDS secos tiveram maior concentração plasmática de aminoácidos essenciais, comparado a vacas consumindo farelo de soja apenas. A suplementação com aminoácidos protegidos não interferiu na concentração total de aminoácidos essenciais no plasma, aumentou apenas a concentração de metionina. As dietas com GDS secos resultaram em maior concentração plasmática de histidina, leucina, metionina, fenilalanina e valina, independente da suplementação com aminoácidos. Na época desse estudo ainda não era descrita a importância de metionina e aminoácidos ramificados como estimuladores da síntese de proteína na glândula mamária. No entanto, hoje é possível inferir que a maior disponibilidade desses aminoácidos conferiu condição de aumento de produção pelos animais, além do uso dos aminoácidos para síntese de caseína ou como fonte de energia.

Liu et al. (2000) compararam grãos de destilaria secos sem os solutos (GD) como concentrado proteico com uma mistura de GD, farelo de soja e farinha de peixe, suplementada

ou não com metionina e lisina protegidas. A premissa desse estudo seria que um *blend* de fontes proteicas entregaria no intestino delgado aminoácidos absorvíveis em proporção mais adequada para a produção de leite. Os autores desejavam ainda testar se a metionina e a lisina protegidas poderiam melhorar o desempenho em dieta com GD e com o *blend* proteico. A dieta com GD não tinha farelo de soja, e os tratamentos com metionina e lisina protegidas visavam fornecer 15 e 50 g/d desses aminoácidos respectivamente. Os autores escolheram a farinha de peixe, o farelo de soja e os GD por considerarem o perfil de aminoácidos destes alimentos diferentes e complementares. A farinha de peixe é rica em metionina e lisina, o farelo de soja rico em lisina, e os GD rico em metionina. Não foi observada diferença na produção de leite, sólidos, ou no consumo de alimentos entre nenhuma das dietas, contrariando a expectativa dos autores. O efeito das dietas na concentração de aminoácidos no plasma foi insignificante, exceto pela maior concentração de leucina nas dietas com GD e tendência de maior concentração de lisina nas dietas com o *blend*. A suplementação de aminoácidos protegidos aumentou apenas a concentração de metionina plasmática.

No estudo de Liu et al. (2000), os autores consideraram a lisina como aminoácido limitante, independente da suplementação de lisina protegida. Os resultados dos trabalhos de Nichols et al. (1998) e Liu et al. (2000) em conjunto apontam que em dietas com grãos de destilaria, mesmo corrigindo o suprimento de lisina, nem sempre melhora desempenho é observada.

Mais recentemente, Paz et al. (2013) revisitaram a estratégia de inclusão de GDS secos com lisina protegida para vacas em lactação. Esses autores testaram duas doses de GDS secos (10 ou 20% da MS) com ou sem suplementação de 14,6 g/d de lisina metabolizável (60 g/d). Nesse estudo, todas as dietas continham metionina protegida (29 g/d). Os GDS secos foram incluídos em substituição parcial ao milho moído e ao farelo de soja. As dietas foram isoproteicas (média 16,7% PB), mas as dietas com GDS secos tiveram menos amido em relação ao controle (26,7% da MS vs. 23 e 20% da MS para 10% e 20% de GDS secos respectivamente). A dieta com 10% de GDS secos e lisina protegida teve o menor consumo. Houve uma tendência de aumento na produção de leite com a dieta com 20% de GDS secos sem lisina (31,8 kg/d vs. 30,2 kg/d em média nos demais tratamentos). O teor e a produção de proteína no leite foram maiores nas dietas com 10% de GDS secos, independente da suplementação com lisina. O fornecimento de lisina protegida não resultou em maior concentração plasmática de lisina nesse estudo, que levou os autores a suspeitar sobre a biodisponibilidade da fonte utilizada. No entanto, a queda no consumo pode ter levado a menor suprimento de proteína metabolizável no intestino. Vacas nas dietas com GDS secos tiveram menor concentração plasmática de lisina,

histidina e valina, mas o percentual e produção de proteína do leite nesses tratamentos não foi prejudicado. Vacas nas dietas com GDS secos tiveram maior concentração plasmática de metionina e leucina. O N-ureico no leite foi mais alto em dietas com os GDS secos. Como os autores reduziram o teor de amido das dietas para inclusão dos GDS secos, a utilização de N pelos microrganismos ruminais pode ter sido prejudicada.

Esse mesmo grupo fez outro trabalho usando GDS secos com baixo teor de extrato etéreo, com ou sem dose elevada de lisina protegida (Paz e Kononoff, 2014). Esse foi um experimento com oito vacas com 188 dias em lactação em média, em quadrado latino 4 x 4. Os animais consumiram 15% da MS como GDS secos, ou 30% da MS como GDS secos, com ou sem suplementação de 42 g/d de lisina metabolizável (128 g/d de lisina protegida). Todas as dietas continham metionina protegida (16 g/d de metionina metabolizável). Os autores aumentaram a dose dos GDS secos com a retirada parcial de milho moído e total de farelo de soja. As dietas foram isoproteicas (16,6% PB) e diferiram um pouco na concentração de amido (30,8% vs. 28,1% da MS). As dietas não afetaram o consumo de MS e a produção de leite (26,9 kg/d em média nos quatro tratamentos). O percentual de proteína do leite foi reduzido com a dieta com 30% de GDS secos e tendeu a recuperar com a inclusão de lisina protegida. A produção de proteína não foi afetada pelas dietas.

A eficiência de extração de aminoácidos pela glândula mamária foi medida no trabalho de Paz e Kononoff (2014) por diferença arterio-venosa. A eficiência de extração mamária de lisina foi maior na dieta com 30% de GDS secos. Esse resultado também foi obtido por Mjoun et al. (2010b) em dieta com 30% de GDS secos de baixo extrato etéreo. Vacas na dieta com GDS secos também tiveram maior extração de aminoácidos essenciais, não-essenciais e aminoácidos ramificados pela glândula mamária tanto no estudo de Paz e Kononoff (2014) quanto no de Mjoun et al. (2010b).

Lobos et al. (2021) testaram quatro dietas com proteína de soja e de coprodutos de etanol de milho. A hipótese era de que as os concentrados de milho seriam deficientes em lisina, sobretudo em dieta de baixa teor de PB (14,9% da MS). A estratégia para adequar a lisina na PNDR seriam combinar proteína de soja com coprodutos de milho (50% do concentrado proteico como farelo de soja e 50% como farelo de glúten de milho e GDS secos) ou acrescentar lisina protegida à dieta com farelo de glúten e GDS secos apenas. A lisina foi acrescentada para fornecer 20 g/d de lisina metabolizável. Na dieta com farelo de soja e proteína de milho, o farelo de glúten e os GDS secos somaram 6,1% da MS. Vacas que consumiram somente proteína de soja ou proteína de soja e milho combinadas tiveram maior consumo de MS, comparadas as que consumiram só proteína de milho ou proteína de milho com a lisina protegida. As vacas

que consumiram apenas proteína de milho produziram menos leite (44,3 kg/d) e não houve diferença entre os outros tratamentos (45,8 kg/d). A suplementação da dieta de proteína de milho com lisina aumentou a produção em 1,1 kg/d, e foi semelhante à dieta com proteína de soja e milho combinadas. A dieta com proteína de milho e soja teve maior a eficiência de uso do nitrogênio e a dieta apenas com proteína de milho, a menor. Os autores concluíram que a dieta com proteína de soja e milho manteve a produção de leite e aumentou a eficiência alimentar, confirmando a complementariedade do perfil de aminoácidos dessas fontes proteicas.

Em conjunto, esses resultados permitem interpretar que apesar da conhecida deficiência de lisina em dietas com concentrado de milho como fonte de proteína suplementar, alguns estudos falharam em obter resposta positiva em produção com o uso de GDS secos e lisina protegida. A exceção foi o trabalho de Lobos et al. (2021), com dieta de baixa proteína. Talvez, nos estudos em que não fora observada resposta, as dietas não eram de fato deficientes em lisina. Provavelmente porque o suprimento de proteína para os animais foi subestimado, ou a eficiência de uso da lisina pela glândula mamária foi subestimada. Por outro lado, maior concentração plasmática de metionina e leucina parece ser comum em estudos que dosaram aminoácidos no plasma de vacas em dietas com GDS secos (Nichols et al. 1998; Liu et al., 2000; Paz et al., 2013; Paz e Kononoff, 2014).

A resposta em proteína do leite é dependente do suprimento integrado de aminoácidos e energia (Firkins et al., 2006; Kebreab et al., 2010). O efeito do aumento da síntese de proteína na glândula mamária pelo maior suprimento de energia, sem mudança na síntese de proteína microbiana, foi demonstrado com experimentos de infusão de glicose pós-ruminal. Rigout et al. (2003) reuniram estudos em que a glicose foi infundida no abomaso ou no duodeno e observou aumento linear na concentração de proteína no leite.

O efeito do aumento da absorção de glicose sobre a síntese de proteína na glândula mamária pode ser mediado pela insulina. Rius et al (2010) demonstraram que na glândula mamária moléculas sinalizadoras intracelulares são responsivas a insulina, IGF-1, e à concentração plasmática de aminoácidos. Em experimento quadrado latino fatorial 2 x 2 caseína e amido foram infundidos no abomaso de vacas em lactação, formando quatro tratamentos: 2,0 kg/d de amido; 0,86 kg/d de caseína; 2,0 kg/d de amido mais 0,86 kg/d de caseína ou controle (somente salina). Os animais foram submetidos a biópsia mamária após as infusões para pesquisar sinalizadores intracelulares. A infusão de amido e caseína aumentou a captação mamária de aminoácidos e a produção de proteína no leite. A ativação da cascata da proteína alvo da rapamicina (mTor) só foi responsiva a infusão conjunta de caseína e amido no abomaso,

o que demonstra a necessidade de estímulo nutricional (disponibilidade de aminoácidos e glicose) e hormonal (insulina e IGF-1) para regulação intracelular da síntese proteica na glândula mamária. Posteriormente, foi demonstrado que aminoácidos específicos tem papel importante na ativação mTor (Appuhamy et al., 2011).

Os aminoácidos importantes para ativação da mTor são metionina, leucina e isoleucina (Appuhamy et al., 2011; Appuhamy et al., 2012). Entre estes aminoácidos, a leucina parece ser o mais potente na ativação dos sinais intracelulares para a síntese proteica (Saxton et al., 2016). Leucina, isoleucina e aminoácidos ramificados não são considerados limitantes para a síntese de proteína no leite. Além disso, resposta em produção de leite e proteína do leite com a infusão de leucina ou aminoácidos ramificados não é bem documentada na literatura (Doelman et al., 2015; Curtis et al., 2018).

Yoder et al. (2020) objetivaram comparar a infusão jugular de metionina, lisina e histidina (MLH) com leucina e isoleucina (IL) em vacas em lactação. O objetivo do estudo foi determinar se a disponibilidade desses aminoácidos no sangue, de maneira conjunta ou como dois grupos distintos, poderia aumentar o desempenho de vacas em lactação de alta produção. Os autores usaram solução salina (controle) ou 21 g/d de metionina, 38 g/d de lisina e 20 g/d de histidina (MLH) ou 50 g/d de leucina mais 22 g/d de isoleucina (IL) ou o tratamento MLH e IL combinados (MLH+IL). A dieta basal nesse experimento não atendia as exigências de metionina, lisina, histidina, leucina e isoleucina, segundo avaliação feita no CNCPS (versão 6.55 usada no estudo). A produção de proteína do leite aumentou com MLH e IL. No tratamento MLH a maior produção de proteína decorreu do maior teor no leite, enquanto no tratamento IL decorreu a maior produção de leite por dia. Com a infusão de IL, mas não de MLH, o volume de leite produzido foi 2,3 kg/d maior que o controle ( $P < 0,01$ ). Não houve interação entre a infusão dos diferentes grupos de aminoácidos, indicando que ambos podem estimular o aumento da produção de proteína e de leite de forma independente. A maior produção de leite e proteína com IL, que ocorreu de forma independente da infusão de MLH, é um achado importante e inédito *in vivo*.

Os estudos que antecederam o de Yoder et al. (2020) demonstraram que o efeito estimulante da leucina e isoleucina sobre a glândula mamária via mTor foram todos *in vitro*. A maior produção de leite com IL foi explicada por aumento do fluxo sanguíneo mamário e da captação de aminoácidos totais, aminoácidos essenciais e aminoácidos ramificados na glândula mamária com a infusão de IL. A eficiência de uso da proteína suprida para produção de leite (medida nesse estudo como eficiência de cada aminoácido suprido ou de todos como agregado) dobrou com a infusão combinada MLH+IL. O aumento da eficiência não foi observado com

infusão de MLH isoladamente. Isso permitiu os autores concluir que outros aminoácidos além daqueles considerados clássicos limitantes para vacas em lactação devem ser levados em consideração em modelos de exigências e na formulação.

Huang et al. (2021) publicaram o impacto dos tratamentos de Yoder et al. (2020) sobre a captação de aminoácidos na glândula mamária, com um ensaio de aminoácidos marcados com  $^{13}\text{C}$ . A infusão de MLH aumentou o teor e a produção de proteína no leite, efeito que não foi observado com IL. No entanto, IL aumentou a produção de leite em 1,4 kg/d ( $P = 0,04$ ), resultado condizente com o obtido por Yoder et al. (2020). Os autores levantaram evidências que o fluxo sanguíneo para a glândula mamária é responsivo ao suprimento de aminoácidos, e que aumentou com a infusão de IL, semelhante ao trabalho anterior. Os autores discutem que a infusão de IL tem efeito positivo sobre a captação mamária de metionina, lisina e histidina. Ou seja, mais leucina e isoleucina podem ser necessárias para direcionar o uso de aminoácidos essenciais para a glândula mamária, quando a disponibilidade plasmática de aminoácidos aumenta. O catabolismo de lisina e metionina na glândula mamária foi maior sem a infusão de IL.

Aumento de leucina no plasma foi observado em diversos estudos com o uso de GDS secos na dieta (Nichols et al., 1998; Christen et al., 2010; Mjoun et al., 2010b; Paz et al., 2013; Lobos et al., 2021), concomitante ou independente de maior concentração de metionina plasmática. Os achados de Yoder et al. (2020) e Huang et al. (2021) em produção de leite, captação e metabolismo mamário de aminoácidos em resposta a leucina e isoleucina permitem levantar a hipótese de que a maior disponibilidade de leucina plasmática comumente observada com uso de GDS secos na alimentação contribui para resposta positiva em produção de leite e proteína do leite.

Ressalta-se que, o achado de Huang et al. (2021) de que o catabolismo mamário de lisina diminuiu com a infusão de leucina e isoleucina, aumentou a eficiência de uso da lisina para síntese de proteína do leite. O maior suprimento de leucina pelos GDS secos poderia poupar lisina do catabolismo para síntese de aminoácidos não essenciais, que ocorre na glândula mamária quando excesso de lisina é provido (Lapierre et al., 2009). Talvez por isso dietas com suprimento de proteína mais alto e GDS secos não levaram a maior produção quando suplementadas com lisina protegida (Liu et al., 2000; Paz e Kononoff, 2014), mas em dieta de suprimento de proteína baixo a lisina protegida combinada com os GDS secos houve aumento de produção (Lobos et al., 2021).

Resumidamente, o uso dos GDS secos em conjunto com outras fontes proteicas na para vacas em lactação pode proporcionar um perfil de aminoácidos completo. A proteína de farelo



de soja e dos GDS secos são complementares não somente do ponto de vista de aminoácido limitante para a síntese de proteína do leite (“modelo do barril”), mas também considerando a importância de aminoácidos específicos como moduladores da síntese proteica na glândula mamária. O entendimento das interações entre aminoácidos no metabolismo pós-absortivo e na glândula mamária ainda é incipiente. Estratégias práticas de aplicação desse conhecimento são ainda mais escassas e pouco testadas na literatura. O uso de coprodutos proteicos do milho juntamente com farelo de soja para vacas em lactação pode ser inserido nesse contexto. Nessa revisão não foram encontrados trabalhos que testaram a combinação de proteína de soja e GDS secos de alta proteína para vacas em lactação.

#### **1.2.12 Teor de extrato etéreo e ácidos graxos dos grãos de destilaria e desempenho na lactação**

Há o conceito na indústria que o uso de GDS secos pode diminuir o teor e a produção de gordura do leite, pois o extrato etéreo dos GDS secos é oriundo do óleo do gérmen do milho, rico em ácidos graxos insaturados. A proporção de ácidos graxos insaturados em GDS secos e em óleo de milho foi de 79,1 e 78,2% dos ácidos graxos totais (Abdelqader et al., 2009). Nesse trabalho a inclusão tanto de óleo de milho quanto de GDS secos em dieta com alto teor de gordura (5,2 a 5,9% de ácidos graxos na MS) para vacas em lactação aumentou o consumo de ácidos graxos insaturados (principalmente C18:2 e C18:1) e reduziu o teor de gordura do leite. Kelzer et al. (2010) descreveu a composição de gérmen de milho, GDS secos, úmidos e de alta proteína, farelo de glúten de milho e farelo de pericarpo de milho. Em todos os alimentos o ácido oleico (C18:2) foi o mais presente (em média 51,8% dos ácidos graxos totais).

O alto teor de gordura dos GDS secos poderia também causar redução no consumo de MS. No entanto, a inclusão de GDS secos em até 20% da MS na dieta não causou redução de consumo em diferentes estudos (Leonardi et al, 2005; Anderson et al., 2006; Kleinschimit et al., 2006), enquanto em outro trabalho com maior quantidade de GDS secos (28,8% da MS) o consumo foi prejudicado (Morris et al., 2018). Em um trabalho revisado o consumo de MS e a produção de leite aumentaram linearmente quando os GDS secos foram incluídos em 10, 20 e 30% da MS da dieta (Janicek et al., 2008). Nesse estudo, os GDS secos substituíram parcialmente forragens, milho e farelo de soja, e as dietas com GDS secos tiveram menor tamanho de partícula. O menor teor de FDN de forragem juntamente com a redução do tamanho de partícula das dietas podem explicar o aumento de consumo observado.

No trabalho de Leonardi et al. (2005) o farelo de soja e casquinha de soja foram substituídos em doses crescentes (0, 5, 10 e 15% da MS) por GDS secos com 13,8% de extrato

etéreo. As dietas foram isoproteicas e iso-FDN. Um tratamento adicional com 1,5% da MS de óleo de milho foi incluído com o objetivo de isolar o efeito do óleo contido nos GDS secos. Os autores obtiveram aumento linear da produção de leite com a inclusão dos GDS secos, e queda no teor de gordura do leite. A produção de gordura não foi prejudicada. A inclusão de 15% de GDS secos não diferiu de 1,5% de óleo de milho, exceto por queda no teor de proteína com o óleo. Os autores atribuíram a produção de leite mais alta com os GDS secos à energia contida no óleo nesse produto.

Ramirez-Ramirez et al. (2015) hipotetizaram que o alto teor de amido e de óleo em dietas com GDS secos tem efeito aditivo sobre a depressão da gordura do leite. Foi comparada dieta contendo GDS secos e baixo teor de amido (18% da MS) e alto teor de extrato etéreo (5,2% da MS) com dieta com teor mais elevado de amido (22% da MS) ou maior teor de extrato etéreo (6,4% da MS), obtido com adição de óleo de milho. Uma quarta dieta reuniu os dois fatores, com 23% de amido e 6,5% de extrato etéreo na MS. Todas as dietas tinha 20% da MS como GDS secos (12% de extrato etéreo na MS). Os autores observaram que amido ou óleo de milho causaram depressão do teor e da produção de gordura do leite, que foi potencializada como a combinação dos dois fatores. A produção de leite e consumo de MS não foram afetados pelos tratamentos. A inclusão de óleo diminuiu a proporção de ácidos graxos com menos de 16 carbonos na gordura do leite, e a dieta de maior teor de amido resultou em proporção intermediária de ácidos graxos curtos na gordura do leite entre o tratamento com óleo e o controle. A combinação de óleo milho e amido acentuou a queda de ácidos graxos curtos na gordura do leite em dieta com GDS secos.

A queda da gordura do leite observada por Ramirez-Ramirez et al. (2015) parece ser mais relacionada ao consumo de ácidos graxos insaturados em excesso que à queda de pH ruminal. O pH ruminal não diferiu entre as dietas ao longo de 24 horas (medido em 4 vacas múltíparas fistuladas no rúmen). As dietas não tinham teor de amido elevado (18% a 23% da MS), mas mesmo a dieta controle e sem adição de óleo tinham alto teor de extrato etéreo (5,5% a 6,2% da MS). Uma forma de reduzir o conteúdo de óleo de milho nos GDS secos é benéfica para sua inclusão em dietas de vacas em lactação, pois reduziria o risco de queda da gordura do leite.

Os GDS secos de baixa gordura foram estudados para vacas em lactação. Mjoun et al. (2010b) testaram doses crescentes de GDS secos de baixa gordura (3,5% de extrato etéreo na MS). O farelo de soja foi substituído gradualmente na dieta pelos GDS secos. A dieta controle tinha de 0% de GDS secos e 17,4% de farelo de soja na MS. A dieta com 10% de GDS secos tinha 11,5% de farelo de soja e a dieta com 20% de GDS secos tinha 5,8% de farelo de soja. A

dieta com 30% de GDS secos não continha farelo de soja. As dietas foram isoproteicas (17,6% PB na MS) e tiveram concentração de amido constante e baixa, em média de 17,7% da MS. O teor de extrato etéreo das dietas aumentou com a inclusão dos GDS secos: de 3,4% na dieta controle a 4,3% com 30% de GDS secos. A produção de leite não diferiu entre tratamentos (35,0 kg/d,  $P = 0,34$ ). Os autores obtiveram aumento linear da concentração e produção de gordura do leite com inclusão dos GDS secos. Vacas no tratamento com 30% de GDS secos produziram 240 g/d a mais de gordura ( $P = 0,04$  para efeito linear) e 3,4 kg/d a mais de leite corrigido para energia ( $P = 0,06$  para efeito linear). Os autores discutem que a maior produção de gordura no leite pode dever-se à inclusão de gordura saturada inerte nas dietas com os GDS secos, que tiveram inclusão de 0,44 a 0,98% da MS de gordura inerte. Outra possibilidade é a maior disponibilidade plasmática de metionina com a inclusão crescente de RFDG. A metionina pode ser precursora de colina e poderia favorecer a síntese de lipoproteínas e o transporte ácidos graxos até a glândula mamária.

Castillo-Lopez et al. (2014) testaram três níveis de GDS secos de baixa gordura (10, 20 ou 30% da MS) em dieta contendo silagem de milho, forragem de alfafa, caroço e algodão, milho moído, farelo de soja e farelo de soja tratado com lignossulfato. Os GDS secos foram colocados gradualmente em substituição ao milho moído, ao farelo de soja e ao caroço de algodão. As dietas continham alto teor de PB (18% da MS) e teor decrescente de amido (de 17 a 25% da MS). No ensaio de desempenho da lactação, os autores usaram 12 vacas em lactação em quadrado latino 4 x 4 com períodos de 21 dias. Os autores não observaram diferença na produção de leite ou sólidos entre os níveis de inclusão de GDS secos, exceto pelo teor de proteína do leite, que tendeu a aumentar linearmente ( $P = 0,07$ ). O consumo de MS aumentou linearmente com a inclusão dos GDS secos, mas não resultou em maior produção.

Para comparar o efeito dos GDS secos tradicionais de baixa gordura, Ramirez-Ramires et al. (2016) utilizaram dieta controle ou com alta inclusão (29,2% da MS) de GDS secos convencionais (12% de EE na MS) ou GDS secos de baixa gordura (6,6% de EE na MS) com ou sem inclusão de sabão de cálcio. As dietas tinham baixa inclusão de forragem (controle: 40,8% da MS e tratamentos: 30,0% da MS). Os grãos de destilaria foram substituíram parcialmente as forragens, milho moído, caroço de algodão e farelo de soja tratado com lignossulfato, e totalmente o farelo de soja. As dietas foram isoproteicas (18,6% da MS) e tiveram teor decrescente de amido (24,7% no controle 17,9% da MS nos tratamentos). A produção de leite tendeu a aumentar com os tratamentos (32,2 kg/d vs. 33,9 kg/d,  $P = 0,08$ ). A inclusão dos GDS secos convencionais reduziu o teor de gordura do leite, que foi recuperado no tratamento com GDS secos de baixa gordura, acrescido ou não do sabão de cálcio. O

consumo de MS foi maior com os grãos de destilaria, mas esse efeito pode estar confundido com o menor teor de FDN de forragem e menor tamanho de partículas nessas dietas. As dietas com GDS secos de baixa gordura recuperaram o teor a produção de gordura do leite, mas tinham menor teor de amido e de FDN que as demais.

Morris et al. (2018) conduziram um estudo de 11 semanas utilizando dieta com farelo de soja, casquinha de soja e gordura inerte, comparada a dieta com GDS secos de baixa gordura (7,4% de extrato etéreo na MS, inclusão de 28,8% da MS na dieta). A dieta com os GDS secos foi acrescida ou não de monensina (500 mg/d). As dietas tinham alto teor de PB (17.5% da MS) e teor de amido moderado (21% da MS). As dietas com GDS secos tenderam reduzir a produção de leite (- 2,0 kg/d em relação ao controle;  $P = 0,10$ ) e reduziram o teor (3,81 vs. 3,00%;  $P < 0,01$ ) e a produção (1,55 vs. 1,23 kg/d) de gordura do leite. A inclusão de monensina tendeu a acentuar o efeito negativo sobre a gordura do leite (2,77% de gordura no leite,  $P = 0,12$ ) e acentuou a queda de produção de gordura (1,08 kg/d,  $P = 0,02$ ). A queda na produção de leite e sólidos deveu-se a redução no consumo de MS e ao maior consumo de ácidos graxos poli-insaturados causada pela inclusão dos grãos de destilaria ( $P = 0,08$ ), que tinham 28% mais ácidos graxos insaturados que o controle.

Os experimentos de desempenho com GDS secos tradicionais de baixo teor de gordura normalmente testaram inclusão de 10% a 30% da MS na dieta. A inclusão dos grãos de destilaria nas dietas da maioria dos trabalhos não foi feita de forma a isolar fatores de confusão, como por exemplo redução do FDN de forragens (Janicek et al., 2008; Ramirez-Ramirez et al., 2016), redução do teor de amido (Castillo-Lopez et al. 2014) e aumento de teor de extrato etéreo (Mjoun et al., 2010b). Dessa forma, carece na literatura estudos com dietas experimentais que realmente isolaram o efeito dos grãos de destilaria sobre a gordura do leite.

### 1.3 REFERÊNCIAS

ABDELQADER, M. M., HIPPEN, A. R., KALSCHEUR, K. F., SCHINGOETHE, D. J., KARGES, K., GIBSON, M. L. Evaluation of corn germ from ethanol production as an alternative fat source in dairy cow diets. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 3, p. 1023-1037, 2009a.

ABDELQADER, M. M., HIPPEN, A. R., KALSCHEUR, K. F., SCHINGOETHE, D. J., GARCIA, A. D. Isolipidic additions of fat from corn germ, corn distillers grains, or corn oil in dairy cow diets. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 11, p. 5523-5533, 2009b.

ALBUQUERQUE, C. S., RABELO, C. B. V., SANTOS, M. J. B., LIMA, M. B., SILVA, E. P., LIMA, T. S., VENTURA, D. P., DUTRA JR., W. M. Chemical composition and

metabolizable energy values of corn germ meal obtained by wet milling for layers. **Brazilian journal of poultry science**, v. 16, n. 1, p. 107-112, 2014.

AL-SUWAIEGH, S., FANNING, K., GRANT, R. J., MILTON, C. T., KLOPFENSTEIN, T. J. Utilization of distillers grains from the fermentation of sorghum or corn in diets for finishing beef and lactating dairy cattle. **Journal of animal science**, v. 80, n. 4, p. 1105-1111, 2002.

ANDERSON, J. L., SHINGOETHE, D. J., KALSCHEUR, K. F., HIPPEN, A. R. Evaluation of dried and wet distillers grains included at two concentrations in the diets of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 8, p. 3133-3142, 2006.

ANDERSON, P. V., KERR, B. J. WEBER, T. E., ZIEMER, C. J., SHURSON, G. C. Determination and prediction of digestible and metabolizable energy from chemical analysis of corn coproducts fed to finishing pigs. **Journal of animal science**, v. 90, n. 4, p. 1242-1254, 2012.

ANDERSON, J. L., KALSCHEUR, K. F., GARCIA, A. D., SCHINGOETHE, D. J., CASPER, D. P., KLEINSCHMIT, D. H. Ensiling characteristics of distillers wet grains with corn stalks and determination of the feeding potential for dairy heifers. **The Professional animal scientist**, v. 31, n. 4, p. 359-367, 2015.

APPUHAMY, J. A. D., BELL, A. L., DEEPTHI NAYANANJALIE, W. A., ESCOBAR, J. HANIGAN, M. D. Essential amino acids regulate both initiation and elongation of mRNA translation independent of insulin in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. **The journal of nutrition**, v. 141, n. 6, p. 1209-1215, 2011.

APPUHAMY, J. A. D., KNOEBEL, N. A., DEEPTHI NAYANANJALIE, W. A., ESCOBAR, J., HANIGAN, M. D. Isoleucine and leucine independently regulate mTOR signaling and protein synthesis in MAC-T cells and bovine mammary tissue slices. **The journal of nutrition**, v. 142, n. 3, p. 484-491, 2012.

BELYEA, R. L., STEEVENS, B. J., RESTREPO, R. J., CLUBB, A. P. Variation in composition of by-product feeds. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 9, p. 2339-2345, 1989.

BELYEA, R., ECKHOFF, S., WALLIG, M., TUMBLESON, M. Variability in the nutritional quality of distillers solubles. **Bioresource technology**, v. 66, n. 3, p. 207-212, 1998.

BELYEA, R. L.; RAUSCH, Kent D.; TUMBLESON, Mike E. Composition of corn and distillers dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. **Bioresource technology**, v. 94, n. 3, p. 293-298, 2004.

BENCHAAR, C., HASSANT, F., GERVAIS, R., CHOUINARD, P. Y., JULIEN, C., PETIT, H. V., MASSÉ, D. I. Effects of increasing amounts of corn dried distillers grains with solubles in dairy cow diets on methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 4, p. 2413-2427, 2013.

BERGER, L., SINGH, V. Changes and evolution of corn coproducts for beef cattle. **Journal of animal science**, v. 88, n. suppl\_13, p. E143-E150, 2010.

BIRKELO, C. P., BROUK, M. J., SCHINGOETHE, D. J. The energy content of wet corn distillers grains for lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 6, p. 1815-1819, 2004.

BÖTTGER, C., SÜDEKUM, K. H. Protein value of distillers dried grains with solubles (DDGS) in animal nutrition as affected by the ethanol production process. **Animal feed science and technology**, v. 244, p. 11-17, 2018.

BRODERICK, G. A. Determination of protein degradation rates using a rumen in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. **British journal of nutrition**, v. 58, n. 3, p. 463-475, 1987.

BRODERICK, G. A., WALLACE, R. J., ORSKOV, E. R., HANSEN, L. Comparison of estimates of ruminal protein degradation by in vitro and in situ methods. **Journal of animal science**, v. 66, n. 7, p. 1739-1745, 1988.

BOWMAN, J. G. P., PATERSON, J. A. Evaluation of corn gluten feed in high-energy diets for sheep and cattle. **Journal of animal science**, v. 66, n. 8, p. 2057-2070, 1988.

BROWN, W. E., BRADFORD, B. J. Effects of a high-protein corn product compared with soy and canola protein sources on nutrient digestibility and production responses in mid-lactation dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 7, p. 6233-6243, 2020.

CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp.*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Food science and technology**, v. 17, p. 102-106, 1997.

CABRITA, A. R. J., MAIA, M. R.G., FREITAS, M., ABREU, J. M. F., FONSECA, A. J. M. Colour score as a guide for estimating the protein value of corn gluten feed. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 91, n. 9, p. 1648-1652, 2011.

CALSAMIGLIA, S., STERN, M. D. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. **Journal of animal science**, v. 73, n. 5, p. 1459-1465, 1995.

CAO, Z. J., ANDERSON, J. L., KALSCHEUR, K. F. Ruminal degradation and intestinal digestibility of dried or wet distillers grains with increasing concentrations of condensed distillers solubles. **Journal of animal science**, v. 87, n. 9, p. 3013-3019, 2009.

CASTILLO-LOPEZ, E., KLOPFENSTEIN, T. J., FERNANDO, S. C., KONONOFF, P. J. In vivo determination of rumen undegradable protein of dried distillers grains with solubles and evaluation of duodenal microbial crude protein flow. **Journal of animal science**, v. 91, n. 2, p. 924-934, 2013.

CASTILLO-LOPEZ, E., RAMIREZ RAMIREZ, H. A., KLOPFENSTEIN, T. J., HOSTETLER, D., KARGES, K., FERNANDO, S. C., KONONOFF, P. J. Ration formulations containing reduced-fat dried distillers grains with solubles and their effect on lactation performance, rumen fermentation, and intestinal flow of microbial nitrogen in Holstein cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 3, p. 1578-1593, 2014.

CHRISTEN, K. A., SCHINGOETHE, D. J., KALSCHUR, K. F., HIPPEN, A. R., KARGES, K. K., GIBSON, M. L. Response of lactating dairy cows to high protein distillers grains or 3 other protein supplements. **Journal of dairy science**, n. 93, v. 5, 2095-2104, 2010.

CORN REFINERS ASSOCIATION, The corn wet milling process. In: **Corn wet milled feed products**, CRA, Pennsylvania Avenue, N.W., Washington D.C., 4<sup>a</sup> ed., 33 p., 2006.

CURTIS, R. V., KIM, J. J. M., DOELMAN, J., CANT, J. P. Maintenance of plasma branched-chain amino acid concentrations during glucose infusion directs essential amino acids to extramammary tissues in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 4542-4553, 2018.

DE BOEVER, J. L., BLOCK, M. C., MILLET, S., VANACKER, J., DE CAMPENEERE, S. The energy and protein value of wheat, maize and blend DDGS for cattle and evaluation of prediction methods. **Animal**, v. 8, n. 11, p. 1839-1850, 2014.

DOELMAN, J., KIM, J. J. M., CARSON, M., METCALF, J. A., CANT, J. P. Branched-chain amino acid and lysine deficiencies exert different effects on mammary translational regulation. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 11, p. 7846-7855, 2015.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal chemistry**. n. 70, v. 1, 1993.

FIRKINS, J. L. et al. Ruminant nitrogen degradability and escape of wet and dry distillers grains and wet and dry corn gluten feeds. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 9, p. 1936-1944, 1984.

FIRKINS, J. L., HRISTOV, A. N., HALL, M. B., VARGA, G. A., ST-PIERRE, N. R. Integration of ruminant metabolism in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, p. E31-E51, 2006.

GUO, J., QIU, X., SALZE, G., DAVIS, D. A. Use of high-protein brewer's yeast products in practical diets for the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Aquaculture nutrition**, v. 25, n. 3, p. 680-690, 2019.

HEUZÉ V., TRAN G., SAUVANT D., RENAUDEAU D., LESSIRE M., LEBAS F., Corn gluten feed. **Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO**. Disponível em <https://www.feedipedia.org/node/714>, 2015 a.

HEUZÉ, V., TRAN, G., LEBAS, F. Maize germ meal and maize germ. **Feedipedia, a programme by INRAE, CIRAD, AFZ and FAO**. Disponível em <https://www.feedipedia.org/node/714>, 2015 b.

HRISTOV, A. N., GIALLONGO, F. Feeding protein to dairy cows-what should be our target?. In: **Proceedings of the 23rd tri-state dairy nutrition conference**, Fort Wayne, Indiana, USA, p. 75-84, 2014.

HUANG, X, YODER, P. S., TEIXEIRA, I. A. M. HANIGAN, M. D. Assessing amino acid uptake and metabolism in mammary glands of lactating dairy cows intravenously infused with methionine, lysine, and histidine or with leucine and isoleucine. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3032-3051, 2021.

JANICEK, B. N., KONONOFF, P. J., GEHMAN, A. M., DOANE, P. H. The effect of feeding dried distillers grains plus solubles on milk production and excretion of urinary purine derivatives. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 9, p. 3544-3553, 2008.

JOHNSTON, D. B. MCALOON, A. J., MOREAU, R. A., HICKS, K. B., SINGH, V. Composition and economic comparison of germ fractions from modified corn processing technologies. **Journal of the american oil chemists' society**, v. 82, n. 8, p. 603-608, 2005.

KEBREAB, E., STRATHE, A. B., DIJKSTRA, J., MILLS, J. A. N., REYNOLDS, C. K., CROMPTON, L. A, YAN, T., FRANCE, J. Energy and protein interactions and their effect on nitrogen excretion in dairy cows. In: **Proceedings of the 3rd EAAP international symposium on energy and protein metabolism**. Ed. GM Crovetto, p. 417-425, 2010.

KELZER, J. M., KONONOFF, P. J., TEDESCHI, L. O., JENKINS, T. C., KARGES, K., GIBSON, M. L. Evaluation of protein fractionation and ruminal and intestinal digestibility of corn milling co-products. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 6, 2803-2815, 2010.

KLEINSCHMIT, D. H., SCHINGOETHE, D. J., KALSCHEUR, K. F., HIPPEN, A. R. Evaluation of various sources of corn dried distillers grains plus solubles for lactating dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 12, p. 4784-4794, 2006.

KLEINSCHMIT, D. H., ANDERSON, J. L., SCHINGOETHE, D. J. KALSCHEUR, K. F., HIPPEN, A. R. Ruminal and intestinal degradability of distillers grains plus solubles varies by source. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 6, p. 2909-2918, 2007.

KONONOFF, P. J., IVAN, S. K., KLOPFENSTEIN, T. J. Estimation of the proportion of feed protein digested in the small intestine of cattle consuming wet corn gluten feed. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 5, p. 2377-2385, 2007.

KRIZ, ALAN, L. Enhancement of amino acid availability in corn grain. In: **Molecular genetic approaches to maize improvement**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. p. 79-89.

KUMAR, DEEPAK; SINGH, VIJAY. Bioethanol production from corn. In: **Corn**. AACC International Press, p. 615-631, 2019..

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Protein distribution pattern in flourey and vitreous endosperm of maize grain. **Cereal chemistry**, v. 81, n. 2, p. 153-158, 2004.



- LARKINS, B. A. Proteins of the kernel. In: **Corn**. AACC International Press, 2019. p. 319-336.
- LAPIERRE, H., DOEPEL, L., MILNE, E., LOBLEY, G. E. Responses in mammary and splanchnic metabolism to altered lysine supply in dairy cows. **Animal**, v. 3, n. 3, p. 360-371, 2009.
- LEONARDI, C.; BERTICS, S.; ARMENTANO, L. E. Effect of increasing oil from distillers grains or corn oil on lactation performance. **Journal of dairy science**, v. 88, n. 8, p. 2820-2827, 2005.
- LEE, Y. H., AHMADI, F., CHOI, D. Y., KWAK, E. S. In situ ruminal degradation characteristics of dry matter and crude protein from dried corn, high-protein corn, and wheat distillers grains. **Journal of animal science and technology**, v. 58, n. 1, p. 1-7, 2016.
- LEE, C., MORRIS, D. L., LEFEVER, K. M., DIETER, P. A. Feeding a diet with corn distillers grain with solubles to dairy cows alters manure characteristics and ammonia and hydrogen sulfide emissions from manure. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 3, p. 2363-2372, 2020.
- LI, C., LI, J. Q., YANG, W. Z., BEAUCHEMIN, K. A. Ruminal and intestinal amino acid digestion of distiller's grain vary with grain source and milling process. **Animal feed science and technology**, v. 175, n. 3-4, p. 121-130, 2012.
- LICITRA, G., HERNANDEZ, T. M., VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal feed science and technology**, v. 57, n. 4, p. 347-358, 1996.
- LIMA, M. B., RABELLO, C. V. B., SILVA, E. P., LIMA, R. B., ARRUDA, E. M. F., ALBINO, L. F. T. Effect of broiler chicken age on ileal digestibility of corn germ meal. **Acta scientiarum animal sciences**, v. 34, p. 137-141, 2012.
- LIMA, L. M., SILVA JR., OGOSHI, R. C. S., REIS, J. S., FRANÇA, J., ZANGERONIMO, M. G., SAAD, F., M. O. B. Evaluation of raw yeast extract (*Saccharomyces cerevisiae*) as an ingredient, additive or palatability agent in wet diet for cats. **International journal of biology**, v. 8, n. 1, p. 1, 2016.
- LIU, C.; SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A. Corn distillers grains versus a blend of protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 83, n. 9, p. 2075-2084, 2000.
- LIU, K. Chemical composition of distillers grains, a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 5, p. 1508-1526, 2011.
- LOBOS, N. E., WATTIAUX, M. A., BRODERICK, G. A. Effect of rumen-protected lysine supplementation of diets based on corn protein fed to lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, 2021.

- MAJONI, S., WANG, T., JONHSON, L. A. Physical and chemical processes to enhance oil recovery from condensed corn distillers solubles. **Journal of the american oil chemists' society**, v. 88, n. 3, p. 425-434, 2011.
- MAXIN, G., OUELLET, D. R., LAPIERRE, H. Ruminant degradability of dry matter, crude protein, and amino acids in soybean meal, canola meal, corn, and wheat dried distillers grains. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 8, p. 5151-5160, 2013.
- MJOUN, K., KALSCHEUR, K. F., HIPPEN, A. R., SCHINGOETHE, D. J. Ruminant degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in soybean and corn distillers grains products. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 9, p. 4144-4154, 2010a.
- MJOUN, K., KALSCHEUR, K. F., HIPPEN, A. R., SCHINGOETHE, D. J., LITTLE, D. E. Lactation performance and amino acid utilization of cows fed increasing amounts of reduced-fat dried distillers grains with solubles. **Journal of dairy science**, v. 93 n. 1, p. 288-303, 2010b.
- MORAIS, S., DERBY, C. A palatability enhancer that improves the performance of feed pellets in shrimp aquaculture. **AquaFeed**, v. 11, p. 48-49, 2019.
- MOREAU, R. A., JOHNSTON, D. B., HICKS, K. B. The influence of moisture content and cooking on the screw pressing and prepressing of corn oil from corn germ. **Journal of the american oil chemists' society**, v. 82, n. 11, p. 851-854, 2005.
- MORRIS, D. L., KIM, S. H., KONONOFF, P. J., LEE, C. Continuous 11-week feeding of reduced-fat distillers grains with and without monensin reduces lactation performance of dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 7, p. 5971-5983, 2018.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 6th rev. ed. **National Academy Press**, Washington, DC, 1989.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. **National Academy Press**, Washington, DC, 2001.
- NICHOLS, J. R., SCHINGOETHE, D. J., MAIGA, H. A., BROUK, M. J., PIEPENBRINK, M. S. Evaluation of corn distillers grains and ruminally protected lysine and methionine for lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 81, n. 2, p. 482-491, 1998.
- PAIVA, E., KRIZ, A. L., PEIXOTO, M. J. V. V. D., WALLACE, J. C., LARKINS, B. A. Quantitation and distribution of  $\gamma$ -zein in the endosperm of maize kernels. **Cereal chemistry**, n. 68, v. 1, p. 276, 1991.
- PALOWSKI, A., YANG, Z., JANG, J., DADO, T. URRIOLOA, P. E., SHURSON, G. C. Determination of in vitro dry matter, protein, and fiber digestibility and fermentability of novel corn coproducts for swine and ruminants. **Translational animal science**, v. 5, n. 2, p. txab055, 2021.

PAZ, H. A., VETH, M. J., ORDWAY, R. S., KONONOFF, P. J. Evaluation of rumen-protected lysine supplementation to lactating dairy cows consuming increasing amounts of distillers dried grains with solubles. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 11, p. 7210-7222, 2013.

PAZ, H. A.; KONONOFF, P. J. Lactation responses and amino acid utilization of dairy cows fed low-fat distillers dried grains with solubles with or without rumen-protected lysine supplementation. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 10, p. 6519-6530, 2014.

PRATT, R. C., PAULIS, J. W., MILLER, K., NELSEN, T., BIETZ, J. A. Association of zein classes with maize kernel hardness. **Cereal chemistry**, n. 72, v. 2, p. 162-167, 1995.

PEREIRA, M. N. Dureza do grão de milho: um tópico brasileiro. **Simpósio internacional em formulação de dietas para gado leiteiro**, v. 3, p. 2-11, 2014.

POWERS, W. J. VAN HORN, H. H.; HARRIS JR, B.; WILCOX, C. J. Effects of variable sources of distillers dried grains plus solubles on milk yield and composition. **Journal of dairy science**, v. 78, n. 2, p. 388-396, 1995.

RAMIREZ-RAMIREZ, H. A.; CASTILLO LOPEZ, E.; HAVARTINE, K. J.; KONONOFF, P. J. Fat and starch as additive risk factors for milk fat depression in dairy diets containing corn dried distillers grains with solubles. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 3, p. 1903-1914, 2015.

RAMIREZ-RAMIREZ, H. A.; CASTILHO LOPEZ, E.; JENKINS, C. J. R.; ALUTHGE, N. D.; ANDERSON, C.; FERNANDO, S. C.; HAVARTINE, K. J.; KONONOFF, P. J. Reduced-fat dried distillers grains with solubles reduces the risk for milk fat depression and supports milk production and ruminal fermentation in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 3, p. 1912-1928, 2016.

RAUSCH, K. D., RASKIN, L. M., BELYEA, R. L., AGBISIT, R. M., DAUGHERTY, B. J., CLEVINGER, T. E., TUMBLESON, M. E. Phosphorus concentrations and flow in maize wet-milling streams. **Cereal chemistry**, v. 82, n. 4, p. 431-435, 2005.

RAUSCH, K. D., BELYEA, R. L. The future of coproducts from corn processing. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 128, n. 1, p. 47-86, 2006.

RIGOUT, S., HURTAUD, C, LEMOSQUET, S., BACH, A., RULQUIN, H. Lactational effect of propionic acid and duodenal glucose in cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 1, p. 243-253, 2003.

RIUS, A. G., APPUHAMY, J. A. D. R. N., CYRIAC, J., KIROVSKI, D., BECVAR, O., ESCOBAR, J., MCGILLIARD, M. L., BEQUETTE, B. J., AKERS, R. M., HANIGAN, M. Regulation of protein synthesis in mammary glands of lactating dairy cows by starch and amino acids. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 7, p. 3114-3127, 2010.

ROBINSON, P. H.; KARGES, K.; GIBSON, M. L. Nutritional evaluation of four co-product feedstuffs from the motor fuel ethanol distillation industry in the Midwestern USA. **Animal feed science and technology**, v. 146, n. 3-4, p. 345-352, 2008.

ROSENTRATER, K. A., LEHMAN, R. M. Physical and chemical properties of corn distillers wet grains. **Applied engineering in agriculture**, v. 24, n. 1, p. 57-62, 2008.

ROSENTRATER, K. A. Production and use of evolving corn-based fuel ethanol coproducts in the US. **Biofuels: status and perspective**, p. 81-98, 2015.

SANTOS, F. A. Glúten de milho na alimentação de aves e suínos. **Revista eletrônica nutritime**, v. 1, n. 3, p. 79-100, 2004.

SAXTON, R. A., KNOCKENHAUER, K. E., WOLFSON, R. L., CHANTRANUPONG, L., PACOLD, M. E., WANG, T., SCHWARTZ, T. U., SABATINI, D. M. Structural basis for leucine sensing by the Sestrin2-mTORC1 pathway. **Science**, v. 351, n. 6268, p. 53-58, 2016.

SCHINGOETHE, D. J. Balancing the amino acid needs of the dairy cow. **Animal feed science and technology**, v. 60, n. 3-4, p. 153-160, 1996.

SCHINGOETHE, D. J. Utilization of DDGS by cattle. In: **Proc. 27th Western Nutrition Conference**, Winnipeg, Manitoba, Canada, p. 19-20, 2006.

SCHINGOETHE, D. J., KALSCHEUR, K. F., HIPPEN, A. R., GARCIA, A. D. Invited review: The use of distillers products in dairy cattle diets. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 12, p. 5802-5813, 2009.

SCHWAB, C. G. Protected proteins and amino acids for ruminants. **Biotechnology in animal feeds and animal feeding**, v. 141, p. 115-141, 1995.

SHUKLA, RISHI; CHERYAN, MUNIR. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial crops and products**, v. 13, n. 3, p. 171-192, 2001.

SHURSON, G. C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. **Animal feed science and technology**, v. 235, p. 60-76, 2018.

SINGH, V., MOREAU, R. A., DONER, L. W., ECKHOFF, S. R., HICKS, K. B. Recovery of fiber in the corn dry-grind ethanol process: A feedstock for valuable coproducts. **Cereal chemistry**, n. 76, v.6, 868-872, 1999.

SINGH, V., JONHSTON, D. B., NAIDU, K., RAUSCH, K. D., BELYEA, R. L., TUMBLESON, M. E. Comparison of modified dry-grind corn processes for fermentation characteristics and DDGS composition. **Cereal chemistry**, v. 82, n. 2, p. 187-190, 2005.

SPARK, M.; PASCHERTZ, H.; KAMPHUES, J. Yeast (different sources and levels) as protein source in diets of reared piglets: effects on protein digestibility and N-metabolism. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 89, n. 3-6, p. 184-188, 2005.

SPIEHS, M. J.; WHITNEY, M. H.; SHURSON, G. C. Nutrient database for distiller's dried grains with solubles produced from new ethanol plants in Minnesota and South Dakota. **Journal of animal science**, v. 80, n. 10, p. 2639-2645, 2002.

STERN, M. D., BACH, A., CALSAMIGLIA, S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. **Journal of animal science**, v. 75, n. 8, p. 2256-2276, 1997.

STOCK, R.; LEWIS, J. M.; KLOPFENSTEIN, TERRY J.; MILTON, C. T. Review of new information on the use of wet and dry milling feed by-products in feedlot diets. **Faculty papers and publications in animal science**. n. 555, 1999.

TITGEMEYER, E. C., MERCHEN, N. R., HAN, C. P., BAKER, D. Assessment of intestinal amino acid availability in cattle by use of the precision-fed cecectomized rooster assay. **Journal of dairy science**, v. 73, n. 3, p. 690-693, 1990.

US GRAINS COUNCIL. A guide to distiller's dried grains with solubles (DDGS). 3<sup>a</sup> ed. Disponível em: <http://www.grains.org/sites/default/files/ddgs-andbook/Complete>, v. 2, 2012.

WANG, H., WANG, T., POMETTO, A. L., JONHSON, A. L. A laboratory decanting procedure to simulate whole stillage separation in dry-grind corn ethanol process. **Journal of the american oil chemists' society**, v. 86, n. 12, p. 1241-1250, 2009.

WATERS, C. J., KITCHERSIDE, M. A., WEBSTER, A. J. F. Problems associated with estimating the digestibility of undegraded dietary nitrogen from acid-detergent insoluble nitrogen. **Animal feed science and technology**, v. 39, n. 3-4, p. 279-291, 1992.

WEISS, W. P., ERICKSON, D. O., ERICKSON, G. M., FISHER, G. R. Barley distillers grains as a protein supplement for dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 72, n. 4, p. 980-987, 1989.

WEISS, W. P. Effects of feeding diets composed of corn silage and a corn milling product with and without supplemental lysine and methionine to dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 3, p. 2075-2084, 2019.

WESTREICHER-KRISTEN, E., STEINGASS, H., RODEHUTSCORD, M. In situ ruminal degradation of amino acids and in vitro protein digestibility of undegraded CP of dried distillers' grains with solubles from European ethanol plants. **Animal**, v. 7, n. 12, p. 1901-1909, 2013.

YODER, P. S., HUANG, X., TEIXEIRA, I. A., CANT, J. P., HANIGAN, M. D. Effects of jugular infused methionine, lysine, and histidine as a group or leucine and isoleucine as a group on production and metabolism in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 3, p. 2387-2404, 2020.

ZANTON, G. I. Analysis of production responses to changing crude protein levels in lactating dairy cow diets when evaluated in continuous or change-over experimental designs. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 6, p. 4398-4410, 2016.

## **CAPÍTULO 2      USO DE GRÃOS DE DESTILARIA DE ALTA PROTEÍNA COM LEVEDURA E ESTRESSE POR CALOR EM VACAS EM LACTAÇÃO**

### **INTRODUÇÃO:**

Probióticos contendo leveduras são muito utilizados na produção de gado de leite. Aumento de produção de leite de 1,2 kg/d com uso de leveduras vivas e mortas para vacas em lactação foi descrito em metanálise (Desnoyers et al., 2009). Contudo, os resultados de desempenho com o uso de leveduras são variáveis. Muitos fatores contribuem para essa variação, pode-se citar diversidade de dietas suplementadas com leveduras, animais em diferentes estágios da lactação e tipos diversos de produtos à base de leveduras usados.

São propostos na literatura alguns mecanismos de ação pelos quais leveduras vivas ou mortas podem melhorar o desempenho animal. As respostas comumente observadas envolvem estímulo ao crescimento bacteriano ruminal (Pinloche et al., 2013), modulação do pH no rúmen (Vyas et al., 2014) e melhoria da digestão de nutrientes (Bitencourt et al., 2011; Ferraretto et al., 2012). Há evidências ainda que o fornecimento de leveduras a vacas em lactação tenha efeitos independentes da modulação da fermentação ruminal, como melhoria nos mecanismos de dissipação de calor (Salvati et al., 2015) e modulação da resposta imune (Zaworski et al., 2014).

Vacas em lactação mantidas em ambiente quente (verão do sudeste brasileiro) suplementadas com leveduras tiveram menor temperatura retal, menor frequência respiratória e aumento de desempenho. Esses resultados foram obtidos tanto com o uso de produto contendo células viva e mortas (Salvati et al., 2015) quanto com cultura de levedura, que contém apenas células mortas (Dias et al., 2018). Nesses trabalhos a concentração plasmática de niacina foi mais elevada em vacas suplementadas produtos à base de levedura em relação ao controle.

A niacina é uma vitamina do complexo B importante na regulação térmica em mamíferos, por estimular o fluxo sanguíneo para a pele. O aumento da síntese microbiana no rúmen está associado ao aumento de fluxo de vitaminas do complexo B para o duodeno. Especificamente a niacina teve a síntese aparente ruminal relacionada positivamente à eficiência de produção de massa microbiana por grama MO fermentada no rúmen (Beuadet et al., 2016). Aumento da excreção urinária de derivados de purina foi observado com suplementação de cultura de levedura para vacas em lactação (Hristov et al., 2010), que sugere efeito positivo da cultura de levedura sobre o crescimento microbiano no rúmen.

Os grãos de destilaria de alta proteína com levedura (DDGY, SJC Bioenergia, Quirinópolis, Brazil) contem, segundo o fabricante, 20% de sua proteína bruta originária da

levedura. É difícil verificar a proporção de produtos de levedura que compõem o DDGY, sobretudo por falta de metodologia analítica (Shurson, 2018). Efeito positivo sobre a dissipação de calor em vacas em lactação foi observado com uso de pequena dose, 15 g/vaca/d apenas, de cultura de levedura (Dias et al., 2018). Por isso, mesmo com uma pequena proporção de produtos ou células de levedura morta no DDGY, pode-se esperar algum benefício na inclusão desse alimento para vacas submetidas a estresse por calor.

Nossa hipótese foi que a inclusão de DDGY na dieta, em substituição parcial ao farelo de soja, poderia melhorar o desempenho de vacas em lactação em ambiente quente. Os produtos de levedura que compõem o DDGY poderiam estimular a síntese ruminal de niacina e melhorar a dissipação de calor pelos animais. O objetivo dessa parte do estudo foi verificar se a inclusão de DDGY na dieta de vacas em lactação em substituição parcial ao farelo de soja contribuiria para o alívio do estresse por calor.

## **2.2 MATERIAIS E MÉTODOS:**

O experimento foi conduzido com animais alojados em um *tie stall* com camas de areia, equipado com ventiladores e aspersores de alta pressão, localizado em Ijaci, Minas Gerais. O local está a 846 m acima do nível do mar, latitude 21° 09' 52.41" sul, longitude 44° 55' 52.40" oeste. A temperatura e a umidade do ar foram registradas dentro do barracão continuamente, com termômetros *data loggers* (EasyLog-USB-2-LCD. Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) posicionados a 2,5 m do chão. Os registros foram feitos a cada 30 minutos por todo período experimental e o índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado segundo a fórmula de Yousef (1985):  $ITU = T + 0.36 \times DP + 41.2$ ; onde T = temperatura (°C) e DP = ponto de orvalho (°C) (Figura 1).

Foram utilizadas 32 vacas holandesas (233 ± 75 dias em lactação no início do experimento), sendo 8 primíparas. Os animais receberam a mesma dieta por duas semanas no período de padronização. A produção de leite, sólidos do leite, peso e condição corporal foram mensurados ao final do período de padronização. Os animais foram blocados em pares por produção de leite, paridade e peso corporal e designados a um dos dois tratamentos. Os animais foram alimentados individualmente por 56 dias no período de comparação. A dieta Controle (CTL) continha 17,8% de farelo de soja na matéria seca. A dieta com DDGY continha 11,6% da matéria seca (MS) de farelo de soja e 6,3% da MS de DDGY. As dietas foram isoproteicas com 16,7% de PB, em média. As dietas estão descritas em detalhe no artigo em que o experimento de desempenho na lactação está relatado. As dietas foram preparadas 2x por dia

em um vagão estacionário (Unimix 1200, Casale, São Carlos, Brasil) e oferecidas aos animais às 07:00 e as 13:00 h.

A temperatura retal e da pele e a frequência respiratória foram mensuradas nos dias 4 e 7 de cada semana do experimento de desempenho. As mensurações foram feitas às 09:00, 15:00 e 22:00 h, aleatoriamente dentro de cada bloco experimental. A temperatura retal foi mensurada com termômetros digitais (G-Tech TH186 Onbo Electronics, Shenzhen, China. Acurácia de 0,1 oC). A frequência respiratória (movimentos / minuto) foi mensurada por observação e contagem dos movimentos do flanco por 30 segundos, em três contagens consecutivas. A média das três contagens foi multiplicada por dois para obtenção dos movimentos por minuto. A temperatura da pele foi mensurada em uma área tricotomizada no flanco e uma na escápula, com termômetro de infravermelho (HighMed 88E, São Paulo, Brasil. Acurácia de 0,1 oC) posicionado a 20 cm da pele do animal.

A taxa de sudção foi avaliada nos dias 4 e 7 de cada semana experimental às 15:00 h, aleatoriamente dentro de cada bloco. Foi usada a técnica colorimétrica com discos de papel filtro impregnados com cloreto de cobalto (Schleger e Turner, 1965). Papel filtro (Whatman no 1, porosidade de 11  $\mu$ m) foi imergido em uma solução de 10% de cloreto de cobalto e socos em estufa de 105 °C por 12 h. Discos do papel (0,5 cm de diâmetro) foram cortados e secos novamente por 2 min. Os discos foram colocados em lâminas histológicas e fixados com fita adesiva transparente. As lâminas foram armazenadas em frascos fechados contendo sílica. Uma área de 3 x 10 cm foi tricotomizada no flanco esquerdo de cada animal, 10 cm abaixo das vértebras lombossacrais um dia antes da mensuração. A fita com os discos foi fixada sobre a área tricotomizada. O tempo para cada disco mudar de azul para rosáceo foi mensurado e registrado para cálculo da taxa de sudção (g/m<sup>2</sup>/h) como:  $38,446.6 / T$ , onde T é o tempo médio em segundos (Schleger and Turner, 1965). A área corporal (m<sup>2</sup>) foi estimada como:  $\text{kg peso vivo}^{0.56} \times 0.15 \text{ m}^2/\text{kg peso vivo}^{0.56}$  (McLean, 1963).

O balanço ácido-básico do sangue venoso colhido na veia jugular foi analisado no d 51 do período experimental, 6 h após a alimentação matinal, em um laboratório clínico comercial (Laboratório Santa Cecília, Lavras, Brasil). As amostras foram entregues no laboratório em menos de uma hora após a coleta. As amostras foram colhidas em tubos de vácuo com heparina, em um intervalo de 30 minutos, aleatoriamente dentro de cada bloco. As amostras foram mantidas resfriadas em gelo até a análise.

#### ***Análise estatística:***



Os dados foram analisados como medidas repetidas no tempo com o PROC MIXED do SAS (Versão 9.3). O modelo foi:  $Y_{ijk} = \mu + B_i + D_j + T_k + D*T_{jk} + e_{ijk}$ . Onde:  $\mu$  = média geral,  $B_i$  = efeito aleatório de bloco ( $i = 1$  a 16),  $D_j$  = efeito fixo de tratamento ( $j = \text{CTL}$  ou  $\text{DDGY}$ ),  $T_k$  = efeito fixo de tempo ( $k = \text{semanas}$ ),  $D*T_{jk}$  = interação entre tempo e tratamento e  $e_{ijk}$  = erro residual. O quadrado médio da vaca aninhada em tratamento foi usado como erro para o efeito de tratamento. A melhor estrutura de covariância foi escolhida segundo o critério de Akaike. A frequência de distribuição de temperatura retal acima de 39,2 °C foi analisada com o procedimento GENMOD do SAS, usando regressão logística para dados binominais. A significância foi declarada com  $P \leq 0,05$  e tendência com  $P \leq 0,10$ .

### 2.3 RESULTADOS:

Durante o período experimental a temperatura ambiente no *tie stall* foi em média de 23,2 °C, com 78% de umidade do ar. O índice de temperatura e umidade (ITU) médio foi de 71,2 e permaneceu acima de 68 por 71,5% do tempo (Figura 1). O ambiente em que o experimento foi conduzido foi quente e úmido e, portanto, desafiador para vacas em lactação quanto a termorregulação.

Vacas que consumiram o DDGY tiveram temperatura da pele mais elevada na escápula às 15:00 e na garupa às 22:00 ( $P = 0,05$ ; Tabela 1). A temperatura retal não foi afetada pelos tratamentos em nenhum dos horários de mensuração. No entanto, vacas no DDGY tenderam a maior proporção de animais com temperatura retal acima de 39,2 °C às 22:00 (+5,1%;  $P = 0,10$ ; Tabela 2).

Vacas que consumiram DDGY tiveram frequência respiratória mais elevada às 09:00 no dia 35 do período experimental ( $P = 0,01$ ) e tenderam a maior frequência respiratória no dia 7 ( $P = 0,07$ ), sem diferença significativa nos demais dias (Figura 2). Vacas no DDGY também tiveram menor taxa de sudação nos dias 11, 35 e 53 do período experimental ( $P < 0,05$ ) e tenderam a menor taxa de sudação nos dias 4 e 32 ( $P < 0,10$ ), sem diferença significativa nos demais dias (Figura 3).

Os animais no tratamento DDGY tiveram menor pressão de  $\text{CO}_2$ , menor concentração de  $\text{CO}_2$  e de  $\text{HCO}_3^-$  e menor excesso de bases no sangue jugular 6 h após a alimentação matinal ( $P \leq 0,01$ ; Tabela 3). A frequência respiratória não foi mensurada no dia da avaliação do balanço ácido-básico do sangue venoso. Os animais recebendo o DDGY tiveram maior frequência respiratória em outros dias do período experimental.

Os resultados não suportam a hipótese que o produto de levedura contido no DDGY possa melhorar a dissipação de calor por vacas em lactação a ambiente quente. Diferente do

observado em outros experimentos com o uso de produtos à base de leveduras, vacas que consumiram o DDGY não demonstraram queda na temperatura retal, frequência respiratória e aumento na taxa de sudação, evidências de melhor alívio do estresse por calor.

## 2.4 TABELAS E FIGURAS:

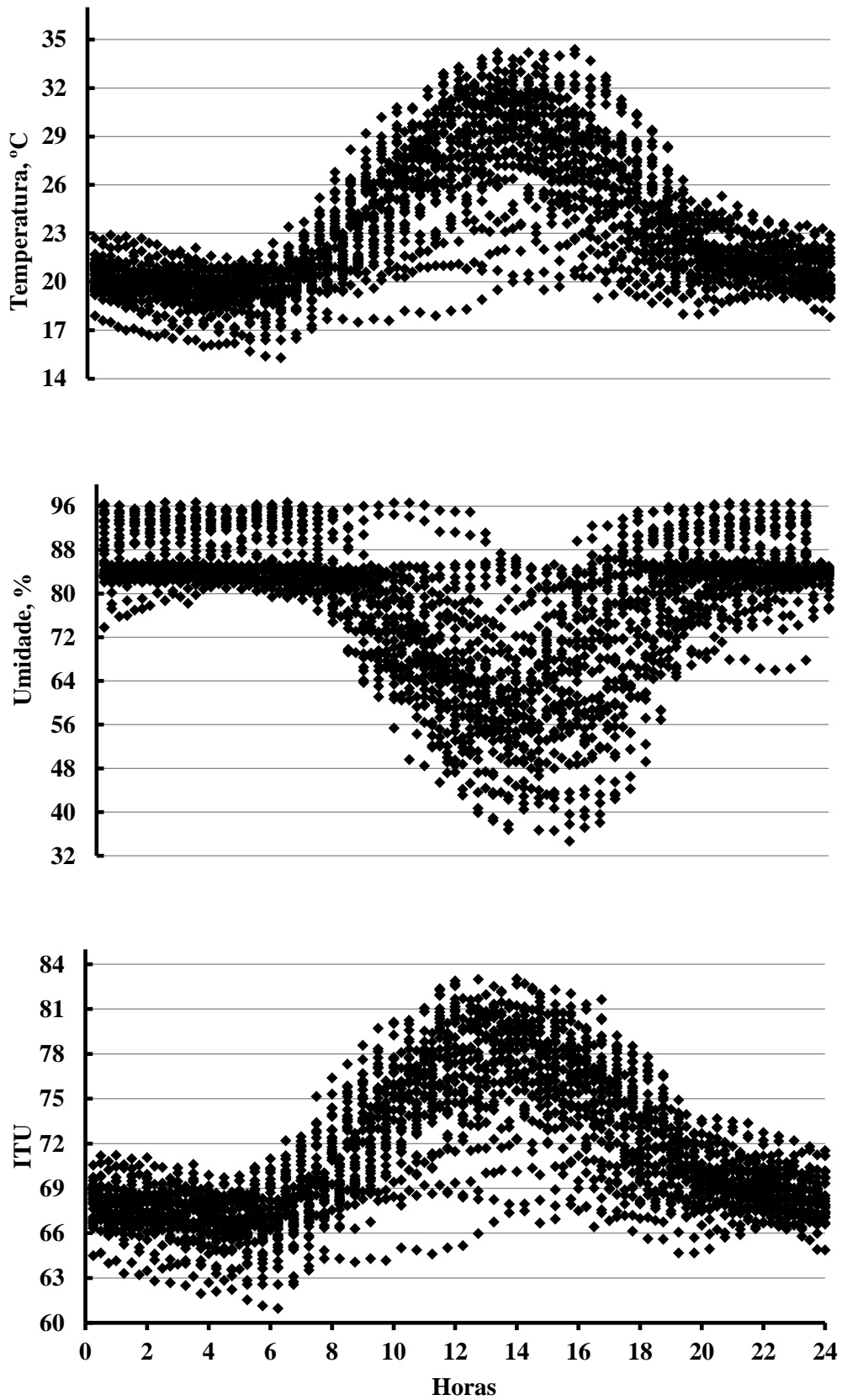


Figura 1. Temperatura, umidade e índice de temperatura e umidade (ITU) dentro do *tie stall*. Temperatura:  $23,2 \pm 4,0$  °C (média  $\pm$  desvio padrão). Umidade:  $78,4 \pm 12,3$  %. ITU:  $71,2 \pm 4,5$ .

ITU  $\geq$  68: 71,5 % do tempo. ITU  $\geq$  72: 36,9 % do tempo. ITU mínimo diário:  $65,9 \pm 1,6$ . ITU máximo diário:  $79,3 \pm 3,1$ . 2733 registros em intervalos de 30 minutos.

Tabela 1. Temperatura da pele, retal, frequência respiratória e taxa de sudção nos tratamentos Controle e grãos de destilaria de alta proteína com levedura (DDGY)

	Tratamentos		EPM	Valor de <i>P</i>		
	Controle	DDGY		Trat.	Tempo	Interação
Temperatura da pele, °C						
Garupa						
09 00 h	34,2	34,0	0,11	0,26	< 0,01	0,52
15 00 h	34,7	34,9	0,08	0,13	< 0,01	0,33
22 00 h	34,9	35,1	0,09	0,05	< 0,01	0,55
Escápula						
09 00 h	34,4	34,3	0,07	0,46	< 0,01	0,25
15 00 h	34,9	35,1	0,67	0,05	< 0,01	0,34
22 00 h	35,4	35,5	0,09	0,38	< 0,01	0,38
Temperatura retal, °C						
09 00 h	38,4	38,4	0,06	0,74	< 0,01	0,49
15 00 h	38,9	38,9	0,07	0,85	< 0,01	0,68
22 00 h	38,6	38,6	0,07	0,69	< 0,01	0,25
Frequência respiratória, mov./min						
09 00 h	51	52	2,0	0,61	< 0,01	0,06
15 00 h	63	63	2,0	0,88	< 0,01	0,71
22 00 h	56	55	1,9	0,71	< 0,01	0,82
Taxa de sudção, g/m <sup>2</sup> /h						
16 00 h	219,9	200,6	11,43	0,25	< 0,01	0,07

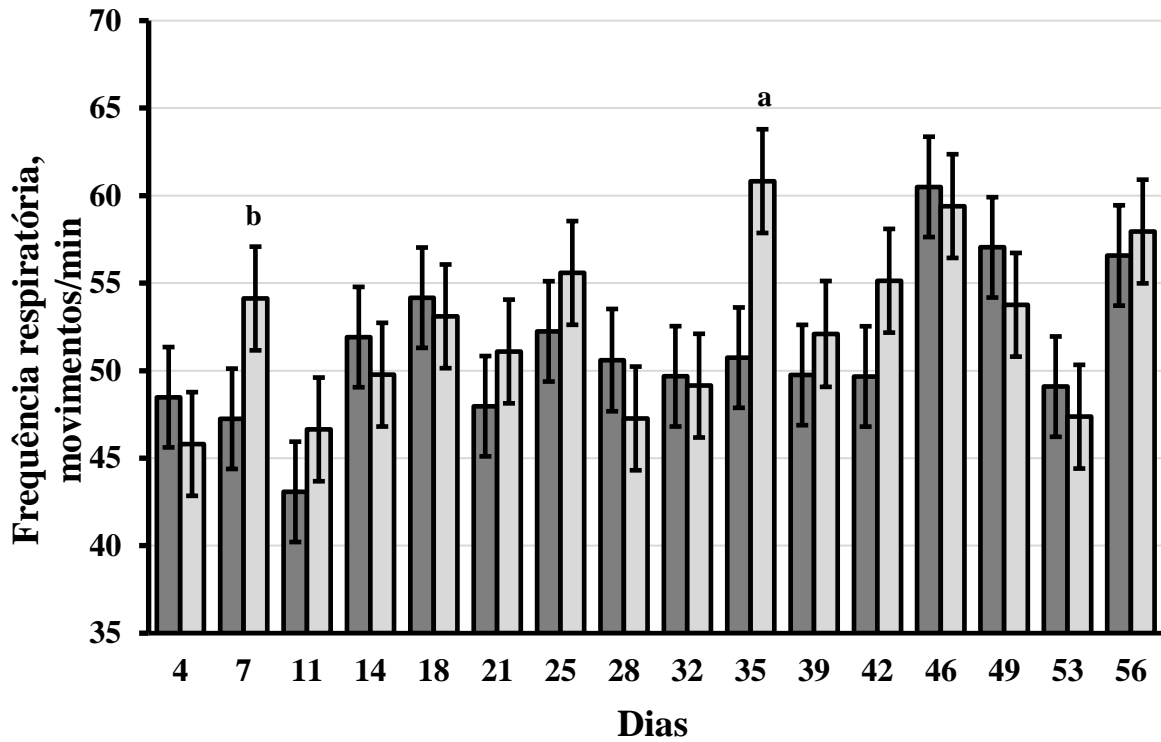


Figura 2. Frequência respiratória às 09:00 nos tratamentos Controle (■) e grãos de destilaria de alta proteína com levedura (□). Valores de  $P$ : 0,61 para efeito de tratamento,  $< 0,01$  para efeito de tempo e 0,06 para a interação entre tempo e tratamento. Opção *slice* do SAS:  $^aP = 0,01$  e  $^bP = 0,07$ .

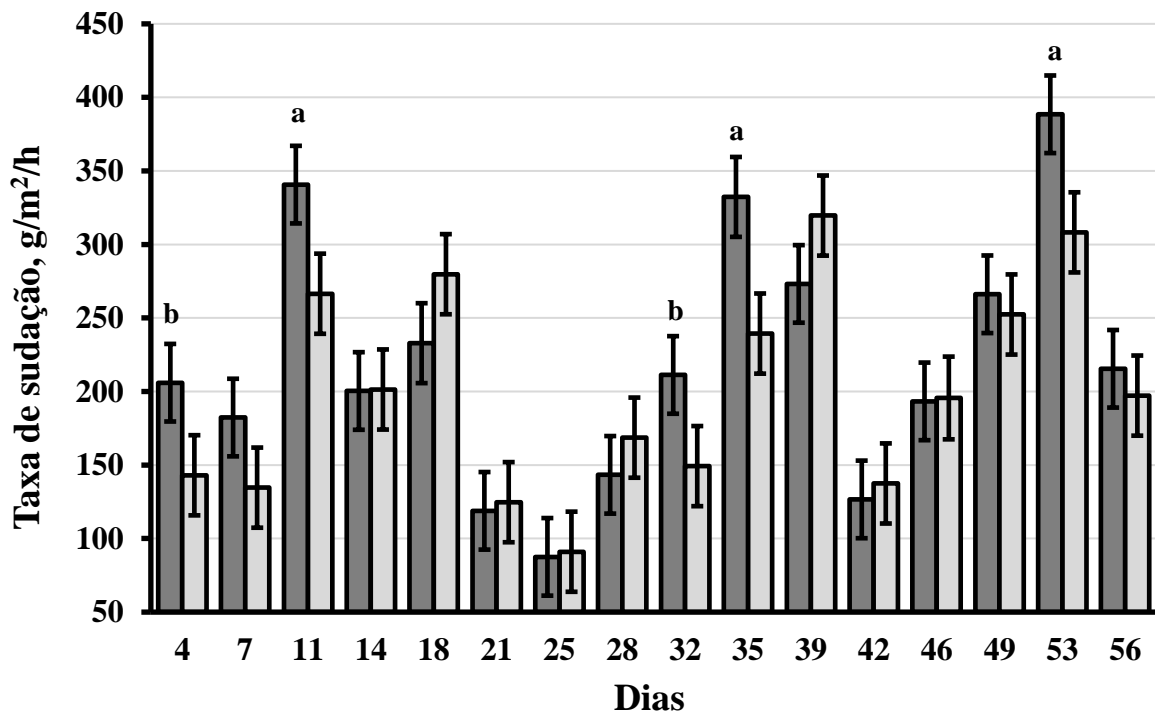


Figura 3. Taxa de sudção às 16:00 nos tratamentos Controle (■) e grãos de destilaria de alta proteína com levedura (□). Valores de  $P$ : 0,25 para efeito de tratamento,  $< 0,01$  para efeito de dia, e 0,07 para interação dia x tratamento. Opção *slice* do SAS:  $^aP \leq 0,05$  e  $^bP = 0,10$ .

Tabela 2. Proporção de vacas (% do total) com temperatura retal  $\geq 39,2$  °C às 09:00, 15:00, e 22:00 h nos tratamentos Controle (CTL) e grãos de destilaria de alta proteína com levedura (DDGY)

	CTL	DDGY	Est <sup>1</sup>	SE <sup>2</sup>	Odds ratio	95% CI <sup>3</sup>		Valor de P
09:00 h	3,9	5,8	0,41	0,42	1,52	0,66	3,48	0,32
15:00 h	29,4	30,1	0,03	0,20	1,03	0,70	1,52	0,86
22:00 h	10,2	15,1	0,45	0,27	1,56	0,91	2,67	0,10

<sup>1</sup>Parâmetro estimado gerado com o GENMOD do SAS usando regressão logística para dados binomiais. O Controle é o zero.

<sup>2</sup>Erro padrão da estimativa.

<sup>3</sup>Intervalo de confiança de 95 % para a *odds ratio*.

Tabela 3. Balanço ácido-básico do sangue jugular no dia 51 do período experimental 6 h após a alimentação da manhã nos tratamentos Controle (CTL) e grãos de destilaria de alta proteína (DDGY)

	CTL	DDGY	EPM	Valor de P
pH	7,42	7,42	0,007	0,83
pCO <sub>2</sub> , <sup>1</sup> mm Hg	46,57	43,90	0,691	0,01
pO <sub>2</sub> , <sup>2</sup> mm Hg	52,34	47,64	5,473	0,47
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , mmol/L	29,74	27,79	0,566	< 0,01
CO <sub>2</sub> Total, mmol/L	31,17	29,14	0,574	< 0,01
Excesso de bases, mmol/L	4,64	2,89	0,591	0,02
SatO <sub>2</sub> , <sup>3</sup> %	82,46	83,10	1,721	0,71

<sup>1</sup>Pressão parcial de CO<sub>2</sub>.

<sup>2</sup>Pressão parcial de O<sub>2</sub>.

<sup>3</sup>% de saturação de oxigênio da hemoglobina.

## 2.5 REFERÊNCIAS:

BEAUDET, V., GERVAIS, R., GRAULET, B., NOZIERE, P., DOREAU, M., FANCHONE, A., CASTAGNINO, D. D. S. Effects of dietary nitrogen levels and carbohydrate sources on apparent ruminal synthesis of some B vitamins in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 99, n. 4, p. 2730–2739, 2016.

BITENCOURT, L. L., SILVA, J. R. M., OLIVEIRA, B. M. L., DIAS JÚNIOR, G. S., LOPES, F., SIÉCOLA JÚNIOR, S., ZACARONI, O. F., PEREIRA, M. N. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. **Scientia agricola**, v. 68, n. 3, p. 301–307, 2011.

DESNOYERS, M. S., GIGER-REVERDIN, G., BERTIN, C., DUVAUX-PONTER, D., SAUVANT, D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 4, p. 1620–1632, 2009.

DIAS, J. D. L., SILVA, R. B., FERNANDES, T., BARBOSA, E. F., GRAÇAS, L. E. C., ARAUJO, R. C., PEREIRA, R. A. N., PEREIRA, M. N. Yeast culture increased plasma niacin concentration, evaporative heat loss, and feed efficiency of dairy cows in a hot environment. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 7, p. 5924-5936, 2018.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D.; BERTICS, S. J. Effect of dietary supplementation with live-cell yeast at two dosages on lactation performance, ruminal fermentation, and total-tract nutrient digestibility in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 7, p. 4017–28, 2012.

HRISTOV, A. N., VARGA, G., CASSIDY, T., LONG, M., HEYLER, K., KARNATI, S. K. R., CORL, B., HOVDE, C. J., YOON, I. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on ruminal fermentation and nutrient utilization in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 2, p. 682–92, 2010.

MCLEAN, J. A. The partition of insensible losses of body weight and heat from cattle under various climatic conditions. **The journal of physiology**, v. 167, n. 3, p. 427, 1963.

PINLOCHE, E., McEWAN, N., MARDEN, J. P., BAYOURTHE, C., AUCLAIR, E., NEWBOLD, J. The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, 2013.

SALVATI, G. G. S., MORAIS JUNIOR, N. N., MELO, A. C. S., VILELA, R. R., CARDOSO, F. F., ARONOVICH, M., PEREIRA, R. A. N., PEREIRA, M. N. Response of lactating cows to live yeast supplementation during summer. **Journal of dairy science**, v. 98, n. 6, p. 4062–73, 2015.

SCHLEGER, A. V.; TURNER, H. G. Sweating rates of cattle in the field and their reaction to diurnal and seasonal changes. **Australian journal of agricultural research**, v. 16, n. 1, p. 92–106, 1965.

SHURSON, G. C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. **Animal feed science and technology**, v. 235, p. 60–76, 2018.

YOUSEF, M. K. 1985. **Stress Physiology in Livestock**. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

ZAWORSKI, E. M., FADDEN, N. A., SANCHEZ, W. K., YOON, I., BOBE, G. Effects of feeding various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product in transition dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 97, n. 5, p. 3081–3098, 2014.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGO**

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

**PARTIAL REPLACEMENT OF SOYBEAN MEAL WITH CORN DISTILLERS  
DRIED GRAINS WITH YEAST FOR DAIRY COWS**



**ABSTRACT**

20

21 This experiment evaluated the partial replacement of soybean meal (SBM) with distillers dried  
22 grains with yeast (DDGY) at the same diet crude protein (CP) content for dairy cows.  
23 Compared to SBM (49.2% CP), the DDGY (50.2% CP) had higher in situ rumen undegradable  
24 CP (RUP) and lower in vitro RUP intestinal digestibility. Thirty-two Holstein cows ( $233 \pm 75$   
25 days in lactation) were individually fed a standard diet for 2 weeks and treatments control  
26 (CTL) or DDGY for 8 weeks. Diets had 16.7% CP and the inclusion of SBM was 17.8% in  
27 CTL and 11.6% in DDGY. In the DDGY diet, the inclusion of DDGY was 6.3%, representing  
28 3.3% of diet CP. Data were analyzed with a repeated measures approach. Significance was  
29 declared at  $P \leq 0.05$  and trends at  $0.05 < P \leq 0.10$ . There was no significant interaction between  
30 treatment and time for any variable measured over time. The DDGY increased milk yield (32.2  
31 vs 31.3 kg/d) at similar dry matter intake (DMI; 22.3 kg/d), increasing the milk to intake ratio  
32 (1.48 vs 1.42). The positive effect of DDGY on milk yield was fast acting and consistent  
33 throughout the experiment. The DDGY tended to increase the yields of milk casein and  
34 protein. The concentrations in milk and the daily yields of fat and lactose did not differ. The  
35 DDGY reduced urea-N in milk (14.1 vs 17.1 mg/dL) and plasma (16.5 vs 19.1 mg/dL, average  
36 of 0, 2, 4, 8, 12, 16, and 20 hours post-feeding). The total tract apparent digestibility of dry  
37 matter, organic matter, starch, and neutral detergent fiber, rumen microbial yield, and plasma  
38 glucose concentration did not differ. The DDGY tended to reduce eating time (272 vs 299  
39 min/d) and had no effect on rumination time (460 min/d). The DDGY increased the proportion  
40 of daily intake in the afternoon (44.0 vs 37.6%). In the morning (0700-1300 h), DDGY  
41 increased the refusal for feed particles  $> 19$  mm (69.3 vs 93.7% of predicted intake) and the  
42 selection in favor of particles  $< 8$  mm (120 vs 101% of predicted intake). The frequency,

43 duration, and size of meals did not differ. The partial replacement of SBM with DDGY had  
44 no effect on diet digestibility, intake, and rumen microbial yield, affected eating behavior,  
45 improved milk yield and feed efficiency, and reduced plasma and milk urea-N, supporting the  
46 in situ estimation of higher RUP supply in DDGY than in SBM.

47 **Keywords:** corn distillers dried grains, ethanol coproduct, protein, yeast coproduct

## 48 **INTRODUCTION**

49 The world's largest ethanol producers are the United States and Brazil, with 56.7 and  
50 33.1 billion liters in 2019, respectively (Renewable Fuels Association, 2020; Confederação  
51 Nacional da Agricultura, 2020). In Brazil, about 4.7 % of the ethanol comes from corn, but this  
52 proportion is increasing in relation to sugarcane ethanol. Distillers dried grains (**DDG**) is a co-  
53 product of the corn ethanol industry and may be a suitable source of protein and energy for  
54 ruminants (Liu, 2011). The development of grain fractionation methods before fermentation  
55 leads to the possibility of obtaining DDG with low ether extract and high protein  
56 concentrations in dry matter (**DM**) (Majoni et al., 2011). The availability of nutritionally  
57 improved DDG type co-products has increased the interest in high-protein, low-fat DDG for  
58 lactating dairy cows (Brown and Bradford, 2020).

59 The DDG sources have large variation in the contents of protein, fiber, ether extract, and  
60 minerals (Liu, 2011). Rumen undegradable protein (**RUP**) was higher and the intestinal  
61 digestibility of the RUP was lower in DDG than in soybean meal (**SBM**) (Kleinschmit et al.,  
62 2007). The low lysine content and digestibility are major concerns in the use of DDG as a feed  
63 component (Lobos et al., 2021), since the amino acid (**AA**) profile of DDG reflects corn AA  
64 composition. The addition of yeast protein and fermentation solubles can affect the protein  
65 quantity and quality of DDG (Belyea et al., 2004). The yeast AA profile is considered to be

66 better than that of corn, although the inclusion of yeast to corn DDG may reduce the  
67 methionine concentration in the feed (Liu, 2011). Li et al. (2012) observed that the DDG  
68 produced from wheat was degraded faster and more extensively in the rumen than DDG from  
69 corn, suggesting that the prevalence of low digestibility flint corn in Brazil (Correa et al., 2002)  
70 is a plausible explanation for the difference in the nutritive value of Brazilian and North-  
71 American DDG produced with similar technology (Palowski et al., 2021). Specific DDG co-  
72 products require evaluation to direct their use as protein sources for dairy cows.

73 FlexyPro is a new, proprietary, high-protein, low-fat corn-yeast fermentation co-product  
74 of the ethanol industry, and has no available data on dairy cows feeding performance. This  
75 corn fermentation co-product can be used in low inclusion in the diet to complement the AA  
76 profile of commonly fed protein sources, such as SBM. Lysine concentration as a percentage  
77 of crude protein (**CP**) is greatest in SBM and least in corn coproducts, whereas methionine  
78 concentration is greater in corn than in soy protein (NRC, 2001). Therefore, the objective of  
79 this experiment was to assess the effect of the partial replacement of SBM protein by DDG  
80 with yeast fermentation co-product (**DDGY**) on lactation performance, urea-N in milk and  
81 plasma, diet digestibility, and eating and rumination behaviors of dairy cows. We hypothesized  
82 that DDGY would improve lactation performance of dairy cows by improving the supply and  
83 balance of absorbable AA.

## 84 **MATERIALS AND METHODS**

### 85 *In situ rumen incubation and in vitro intestinal digestibility of protein sources*

86 Ruminal in situ incubations of DDGY and SBM (Cargill Nutrição Animal, Uberlândia,  
87 Brazil) were performed to determine ruminal kinetic parameters of CP. Multifilament nylon  
88 bags (Marantex, São Paulo, Brazil) of 10 × 20 cm were filled with 5 g of the protein sources

89 (25 mg/cm<sup>2</sup>). Bags were washed with acetone and dried for 12 hours on a 65°C oven and  
90 weighed before receiving the samples. Incubations were performed in 2 rumen cannulated  
91 lactating dairy cows fed a corn silage-based diet. Bags were inserted into the rumen in reverse  
92 order for 48, 24, 16, 12, 8, 4, and 2 hours, so all the bags were removed simultaneously. Four  
93 bags per feed were incubated for 48, 24, and 16 hours; 3 bags were incubated for 12 hours, and  
94 2 bags were incubated for 8, 4, and 2 hours. The 0 hour time point bags were not placed into the  
95 rumen, but were treated to the same rinsing procedures described for the other time points.  
96 After removal from the rumen, bags were immediately placed on ice and then washed on a  
97 washing machine cycle for 19 minutes. Bag incubation residues were dried at 65°C for 72  
98 hours, weighed, and the residues were analyzed for CP as previously described. Bag residues  
99 CP was not corrected for microbial protein contamination, as this procedure is described to be  
100 irrelevant for corn protein concentrates (Menezes et al., 2017). The incubation procedure was  
101 repeated 3 times with a 1-week interval between incubations, using the same rumen-fistulated  
102 cows.

103       The instantaneously degradable fraction A (% of CP) was the N that disappeared from  
104 the 0-hour bag. The indigestible fraction C was the N in the 48-hour residue. The slowly  
105 degradable fraction B was calculated as the difference between total N and the sum of fractions  
106 A and C. The fractional degradation rate of B (kd. %/h) was the linear decay rate of the natural  
107 logarithm of N residue as a proportion of initial N, after removing fraction C from each bag  
108 residue. The rumen degradable protein (RDP. % of CP) was calculated as: Fraction A +  
109 Fraction B × [kd/(kd + kp)], where kp is the fractional passage rate assumed as 4, 5, 6, and 7  
110 %/h, to represent cows differing in production and intake potential. The in vitro intestinal  
111 digestibility of the RUP was estimated on the 12 and 16 hour bag residues of ruminal

112 incubation, according to Calsamiglia and Stern (1995), as adapted by Gargallo et al. (2006) for  
113 a Daisy II equipment (Ankom Technology Corporation, Fairport, USA).

#### 114 *Location, Cows, and Experimental Design*

115 The lactating cow experiment was conducted from December 2017 to February 2018 during  
116 the hot-rainy season of southeast Brazil, in an open-walled, sand-bedded tie-stall barn with  
117 fans and high-pressure sprinklers. The research center is located at 846 m above sea level, 21°  
118 09' 52.41" latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west. Environmental temperature and  
119 relative humidity at the center of the barn were measured at 30-min intervals with a digital  
120 thermometer (EasyLog-USB-2-LCD. Lascar Electronics, Salisbury, United Kingdom) located  
121 2.5 m from the floor. The temperature-humidity index (**THI**) was calculated according to  
122 Yousef (1985):  $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$ ; where T = temperature (°C) and DP = dew point  
123 (°C). Temperature was  $23.2 \pm 4.0$  °C and humidity was  $78.4 \pm 12.3$  % (mean  $\pm$  SD; 2,733  
124 recordings). The THI was  $71.2 \pm 4.5$ , THI > 68 was observed 71.5% of time.

125 Thirty-two Holstein cows ( $233 \pm 75$  days in lactation at the beginning of the experiment,  
126 8 primiparous), were individually fed the same total mixed ration (**TMR**) for a 2-week  
127 standardization period. Milk yield and components, DM intake (**DMI**), body weight (**BW**),  
128 and body condition score (**BCS**) at the end of the standardization period were measured and  
129 used as covariate in the statistical model. Cows were pair-blocked based on parity and  
130 milk yield and assigned to a treatment for a 56-day comparison period, in a covariate adjusted  
131 randomized block design with repeated measures over time. Treatments were: 1) control diet  
132 (**CTL**) with the inclusion of 17.8% of DM as SBM; and 2) diet with 11.6% of DM as SBM  
133 and 6.3% of DM as DDGY. The composition of the diets is reported in Table 1.

134 *Feed Management, Variables, and Analytical Procedures*

135         The two TMR were mixed 2 x/d in a vertical 1.2 m<sup>3</sup> stationary vertical mixer and cows  
136 had access to new feed at 0700 and 1430 h. Silage DM concentration was monitored weekly  
137 with a microwave oven and diets were adjusted as necessary. Individual cow intake was  
138 assessed daily by recording the amount of feed offered and orts. The feed was offered in  
139 sufficient quantity to obtain at least 10% of the offered as daily refusals.

140         Samples of ingredients and orts per cow were collected daily and composite samples  
141 were formed per week. Composite samples were dried at 55°C for 72 h and ground through a 1-  
142 mm mesh Wiley screen. The DM concentration was determined by drying at 100°C for 24 h.  
143 The nutrient composition of the consumed diet was calculated for each cow based on the  
144 composition of offered ingredients and orts on a DM basis. Diet ingredients and orts were  
145 analyzed for CP, ash-free neutral detergent fiber (**NDF**), ash, and starch plus free glucose. Diet  
146 ingredients were analyzed for ether extract (**EE**), and orts EE concentration was considered  
147 the same as offered diet. The CP concentration was determined with a micro Kjeldahl  
148 apparatus (AOAC International, 2002), ash by incineration at 550°C for 8 h (AOAC  
149 International, 1990), and NDF by filtration in porous crucibles with heat stable alpha-amylase  
150 and sodium sulfite (AOAC International, 1990). The **EE** was analyzed as in AOAC  
151 International (1990), and starch plus free glucose was enzymatically determined according to  
152 Hall (2009). The non-fiber carbohydrate fraction was calculated: 100 - (CP + EE + ash +  
153 NDF). The amino acid composition of DDGY was determined in a commercial laboratory  
154 (Eurofins Alac, Indaiatuba, Brazil) by ionic chromatography with ultraviolet detection after  
155 acid hydrolysis of the protein. Amino acid composition of soybean meal used on experiment

156 was determined by near infrared spectroscopy (Agrocares MEMS Technology, wavelength  
157 range 1300 – 2550 nm, Wageningen, Netherlands).

158 Cows were milked 3 x/d in an adjacent herringbone parlor starting at 0500 h, 1300 h,  
159 and 1930 h and milk yield was recorded daily. Proportional milk samples from each milking  
160 were obtained on days 11 to 14 of the standardization period and on days 6 and 7 of each week  
161 of the comparison period. Milk components, somatic cell count (**SCC**), and milk urea-N  
162 (**MUN**) were analyzed by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska, MN) in a  
163 commercial laboratory (Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association,  
164 Curitiba, Brazil). Milk energy secretion (Mcal/d) was calculated as (NRC, 2001):  $[(0.0929 \times$   
165  $\% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ crude protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$ . The secretion of  
166 energy corrected milk (kg/d) was calculated as:  $\text{Milk energy secretion}/0.70$  (assumes 0.70  
167 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% crude protein, and 4.6% lactose). The BCS was the mean  
168 of the same 3 independent evaluators (1 to 5 scale. Wildman et al., 1982) on day 14 of the  
169 standardization period and on days 14, 28, 42, and 56 of the comparison period. The BW was  
170 measured after the morning milking on days 13 and 14 of the standardization period and on  
171 days 13, 14, 27, 28, 41, 42, 55, and 56 of the comparison period (mean value was used per week).

172 The total tract apparent digestibility of DM, organic matter (**OM**), NDF, non-NDF OM,  
173 CP, and starch were determined on days 54 to 56 by collection of feces in buckets. Feces were  
174 collected concurrent to defecation during three 8-hour sampling periods and weighed. The  
175 second and third sampling periods were each delayed by 8 hours, thus representing a 24-hour  
176 collection. Fecal aliquots (1% of fresh weight) were taken and immediately frozen along the  
177 collection period and a composite sample was formed per cow. Composite fecal samples were  
178 dried for 72 hours at 55°C and ground through a 1-mm mesh screen. The DM concentration

179 was determined by drying at 100°C for 24 hours. Concentrations of NDF, ash, and starch were  
180 determined as described previously. The digestible OM intake (**DOMI**) during the digestibility  
181 evaluation was calculated.

182 The urinary output was collected in buckets, simultaneously to fecal sampling, to  
183 estimate the relative rumen microbial synthesis based on allantoin excretion (mmol/d). A 20%  
184 sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L buckets and urine was added to it during  
185 the collection period. At the end of 3-day collection period, composite urine samples were  
186 diluted 1:5 with a 4% sulfuric acid solution and frozen at -20°C. Allantoin was determined  
187 according to Chen and Gomes (1992).

188 Plasma samples were obtained on day 53 to determine the concentration of plasma urea-  
189 N (**PUN**). Samples were obtained at random within block immediately before the first daily  
190 feeding (0700 h) and at 2, 4, 8, 12, 16, and 20 hours after feeding. Blood was harvested on  
191 vacuum tubes containing EDTA and potassium fluoride. The blood sampling procedure lasted  
192 20 minutes. Samples were centrifuged at  $2,118 \times g$  for 10 min to obtain plasma, which was  
193 kept at -20 °C until analysis. The PUN was analyzed with a laboratory kit (Urea 500, Doles  
194 Reagentes para Laboratórios, Goiânia, Brazil). Plasma glucose concentration was measured  
195 on days 11, 25, 39, and 53 on blood samples obtained 12 hours after morning feeding. Blood  
196 was harvested, centrifugated to obtain the plasma and stored as described for PUN. Glucose  
197 was analyzed with a laboratory kit (Glicose Enzimática Líquida, Doles Reagentes para  
198 Laboratórios, Goiânia, Brazil).

199 Chewing activity and feed particles sorting behavior were measured on days 52 to 54.  
200 Chewing was evaluated by visual observation of the buccal activities of each cow at 5-min  
201 intervals continuously for 24-hour periods. Daily values were averaged per cow. Buccal



202 activities evaluated were: eating, rumination, drinking, and idleness. Eating and rumination per  
203 unit of DMI were calculated using DMI of the day in which chewing activity was evaluated.  
204 A meal was defined by at least two consecutive 5-minute ingestion events following at least  
205 10 minutes of idleness or rumination (Mullins et al., 2012). The intermeal interval was  
206 calculated by time not ingesting (rumination + idleness) divided by the number of meals/day  
207 minus 1. The duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a  
208 chronometer. Five evaluators observed the behavior of all cows individually, after feed  
209 offering at 0700 h until the last cow finished its first meal. The proportions of daily intake  
210 between 0700 and 1300 h, 1300 and 1900 h, and 1900 and 0700 h were measured by weighing  
211 the feed in the bunk at 1300, 1900 and before the 0700 h feeding. Feed sorting behavior was  
212 evaluated as the proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen and above and  
213 below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator (Leonardi and Armentano,  
214 2003). Particle size distribution was evaluated at 0700 and 1300 h for the offered TMR and at  
215 1300, 1900, and before the 0700 h feeding for refusals. Feed refusals at 1300 h were mixed  
216 with feed offered for measurement of the offered TMR particle size of each cow. The predicted  
217 intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained on screen  $\times$  kg of TMR  
218 consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on screen  $\times$  kg of TMR  
219 offered - % orts retained on screen  $\times$  kg of orts. The selection index was:  $100 \times (\text{observed}$   
220  $\text{intake/predicted intake})$ . Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100%  
221 represent preferential intake, and equal to 100% represent no selection.

### 222 *Statistical Analysis*

223 The data were analyzed as repeated measures with the Mixed procedure of SAS  
224 statistical software (version 9.3, 2011; SAS Institute Inc., Cary, USA) with the model:  $Y_{ijk} =$

225  $\mu + CV + B_i + D_j + T_k + D*T_{jk} + e_{ijk}$ . Where:  $\mu$  = overall mean, CV = covariate (measure of  
226 the same variable at the end of the standardization period),  $B_i$  = random block effect ( $i = 1$  to  
227 16),  $D_j$  = fixed treatment effect ( $j = \text{CTL or DDGY}$ ),  $T_k$  = fixed time effect ( $k = \text{days or}$   
228 weeks),  $D*T_{jk}$  = interaction between treatment and time, and  $e_{ijk}$  = residual error. For  
229 variables measured only during the comparison period, the same model was used, but without  
230 the covariate adjustment. The mean square for the effect of cow nested within treatment was  
231 used as the error to test the treatment effect. For variables measured once during the experiment  
232 the effects of time and its interaction with time were removed from the model and the residual  
233 error tested the treatment effect. The best covariance structure was defined by the Akaike's  
234 Information Criterion between first order autoregressive and compound symmetry. The  
235 protein degradability data was analyzed with a model with the fixed effects of protein source  
236 (SBM, DDGY) and incubation order (1 to 3) and the random effect of cow (1, 2). Significance  
237 was declared at  $P \leq 0.05$  and trends at  $0.05 < P \leq 0.10$ .

238

## RESULTS

239 The DDGY was included at 6.3% of diet DM in partial replacement of SBM (Table 1).  
240 Other feed ingredients, except SBM, were constant in the diet. Soybean meal and DDGY had  
241 similar CP concentrations (49.6 and 50.2% of DM, respectively) and DDGY had higher NDF  
242 content than SBM (43.7 and 10.3% of DM) (Table 2). In DDGY, the concentration of the three  
243 AA (% of CP) considered as first limiting for lactating dairy cows were 2.06% of Met, 3.62%  
244 of Lys, and 2.98% of His and the sum of branched chain AA (Ile + Leu + Val) was 21.22%  
245 (Table 3). The samples analyzed for amino acids of SBM and DDGY had 54.1 and 51.0% CP  
246 om DM basis, respectively. The SBM sample had 14.1 g per kilogram of total amino acids as  
247 Met, 62.7 g per kilogram of total amino acids as Lys, and 173.0 g per kilogram of total amino

248 acids as branched chain AA. The DDGY sample had 20.6 g per kilogram of total amino acids  
249 as Met, 36.2 g per kilogram of total amino acids as Lys, and 212.2 g per kilogram of total  
250 amino acids as branched chains AA.

251 Kinetic parameters of the in situ ruminal CP degradation and the in vitro intestinal RUP  
252 digestibility are in Table 4. Compared with SBM, DDGY had similar instantaneously  
253 degradable fraction A and higher indigestible fraction C, resulting in the smallest pool size for  
254 the slowly degradable fraction B. The RDP at passage rates ranging from 4 to 7%/h and the  
255 RUP intestinal digestibility of the 12 h and 16 h incubation residues were lower in DDGY.  
256 The protein profile of diet CTL and DDGY based on feed ingredient analysis, measured  
257 kinetics of CP digestion of SBM and DDGY, and lactation performance during the experiment  
258 are in Table 5. The NRC (2001) dairy model evaluation of the diets suggested that the  
259 replacement of SBM with DDGY reduced RDP and increased RUP concentration in DM,  
260 increased Met and reduced Lys as proportions of metabolizable protein (MP), reduced the Lys  
261 to Met ratio, had minor effect on histidine, increased Val and Leu and reduced Ile in MP, and  
262 increased the flow of digestible essential AA (+ 14 g/d).

263 Table 6 reports DMI, lactation performance, milk composition, and feed efficiency. The  
264 diet DDGY increased milk yield (+ 0.9 kg/d) and tended to increase energy corrected milk  
265 yield (+ 0.7 kg/d), at similar DMI. Feed efficiency was increased by DDGY. The positive  
266 response in milk yield was fast acting and relatively consistent throughout the experiment  
267 (Figure 1). Milk components concentration did not differ, but trends were observed for  
268 increased yields of milk casein (+ 27 g/d) and crude protein (+ 34 g/d) for DDGY. Milk urea-  
269 N was reduced (17.1 vs 14.1 mg/dL) and PUN was lower throughout the day on DDGY than  
270 CTL (Figure 2). The milk SCC, BCS, and BW did not differ.

271 The total tract apparent digestibility of nutrients, DOMI, daily secretion of urinary  
272 allantoin, and plasma glucose concentration over time did not differ (Table 7). Although a  
273 biologically significant increase in total tract NDF digestibility was observed for DDGY (+  
274 7.1 %-units), this difference could be supported only by a weak trend ( $P = 0.12$ ).

275 Chewing and particle size sorting behaviors are in Table 8. The DDGY tended to reduce  
276 the daily eating time (- 27 min/d), but had no effect on the eating to DMI ratio or meal pattern.  
277 Rumination and total chewing behaviors did not differ. The proportion of the daily intake in  
278 the afternoon was increased by 6.4 %-units for DDGY, but the proportions of the daily intake  
279 in the morning and night were only numerically reduced for DDGY. In the morning, cows on  
280 DDGY had greater refusal of long feed particles (> 19 mm) and selection in favor of short  
281 particles (< 8 mm) than CTL. During this same period of the day, medium size particles (8 -  
282 19 mm) were refused on DDGY and selectively consumed on CTL. Daily feed refusals were  
283 on average 11.6 % of offered and did not differ between treatments.

## 284 DISCUSSION

285 The increase in milk yield at the same DMI on diet DDGY suggests that the partial  
286 replacement of SBM by DDGY was beneficial to lactation performance. The DDGY diet  
287 increased feed efficiency without affecting the covariate adjusted BW and BCS. The mean  
288 daily intake of DDGY was 1.6 kg/cow in replacement to approximately 1/3 of the SBM in the  
289 diet. Diets had no effect on the total tract digestibility of nutrients, energy intake estimated by  
290 DOMI, rumen microbial yield, and glucose concentration in plasma. The theoretical estimate  
291 of the NRC (2001) dairy model suggests that diet DDGY increased the flow of digestible  
292 essential AA (Tables 5), a plausible explanation for the increase in lactation performance, even  
293 at reduced Lys flow (Arriola Apelo et al., 2014). Although NRC (2001) model estimated a

294 negative RDP balance in the rumen on diet DDGY, rumen microbial synthesis estimated by  
295 the daily excretion of allantoin in urine did not differ, suggesting that the model predicted flow  
296 of digestible AA may have been under-predicted on DDGY. The trends for increased protein  
297 and casein secretions with DDGY suggests that AA flow was indeed increased by this diet.

298         The estimated pool size of CP fractions A, B, and C, the kd of fraction B, and the RUP  
299 digestibility of the 16 h incubations for SBM and DDGY (Table 4) were used to generate the  
300 protein data of the diets reported in Tables 5. The DDGY RDP content (% of CP) was  
301 estimated to be lower than the RDP in SBM. This is consistent with the reductions observed  
302 in MUN and PUN when DDGY replaced the same amount of CP from SBM in diet DDGY.  
303 The estimated RUP of SBM ranged from 30.5 to 41.7% of CP, depending on the kp (4 to  
304 7%/h). These estimates are reasonable RUP values for SBM in lactating cow diets. For  
305 instance, NRC (2001) predicts SBM CP to be 42.6% RUP (with DMI at 4.0% of BW and 50%  
306 forage in the diet; kp of 7.4%/h), while the recently launched new dairy model (NASEM,  
307 2021) predicts SBM with 33% of CP as RUP (with a static kp of 5.28%/h). Our predicted SBM  
308 RUP at a 5.28%/h kp would be 35.1% of CP. At these kp values, the RUP estimates of DDGY  
309 ranged from 60.6 to 65.4% of CP, slightly above feed table values around 50% of CP for DDG  
310 with solubles with 29.7% CP in DM (NRC, 2001). On the new NASEM (2021) publication,  
311 high protein, dried DDG with solubles is described with 39% of CP and 47% of CP as RUP at  
312 a kp of 5.28%/h. In our study, the kd of fraction B in DDGY was 4.4%/h, similar to literature  
313 values for north American conventional DDG with solubles (Kleinshimit et al., 2007) and high  
314 protein DDG (Mjoun et al., 2010a; Maxin et al., 2013; Lee et al., 2016). The NASEM (2021)  
315 considered the kd of fraction B in high protein DDG with solubles as 5%/h. Fraction A was  
316 lower (17.8 vs 26% of CP) and fraction C was higher (38.8 vs 12% of CP) in DDGY than in

317 NASEM (2021) high protein DDG. The high content of fraction C in high protein DDG has  
318 been previously described (Lee et al., 2016). In relation to the NASEM (2021) high protein  
319 DDG, DDGY had 29% higher CP in DM and higher concentration of essential AA in true  
320 protein (+ 29% Lys, + 14% Val, + 12% His, + 10% Arg, + 9% Thr, + 6% Phe, + 5% Ile, + 4%  
321 Met, and + 1% Leu). There is considerable variation in the composition of DDG coproducts  
322 among ethanol plants and batches of feed from the same plant (Liu, 2011).

323         However, in our experiment the values for the RUP intestinal digestibility for DDGY  
324 and SBM were lower than expected. According to the NRC (2001) dairy model, expected  
325 values for RUP digestibility would be around 80% of RUP for DDG with solubles and around  
326 93% of RUP for SBM. Based on this model, the RUP digestibility of DDG was expected to  
327 be around 86% of the RUP digestibility of SBM. In our experiment, the RUP digestibility of  
328 DDGY was 76% and 83% of the RUP digestibility of SBM, if the residues of 12 h or 16 h  
329 rumen incubations were considered, respectively. The ratio of RUP digestibility of DDGY and  
330 SBM on 16 h residue is close to values on NASEM (2021), where SBM has 91% of RUP  
331 digestibility and high protein DDG has 75% of RUP digestibility. An adjusted RUP  
332 digestibility of DDGY was calculated to be 77% of RUP, assuming 93% RUP digestibility for  
333 SBM and RUP digestibility of DDGY as 83% of SBM. Using these higher RUP digestibility  
334 coefficients for DDGY and SBM, the estimated parameters for the DDGY diet would be MP  
335 balance of 315 g/d, Met as 1.84% of MP, Lys as 6.10% of MP, Lys/Met of 3.31, and the flow  
336 of digestible AA of 1123 g/d. For the CTL diet it would be MP balance of 299 g/d, Met as  
337 1.79% of MP, Lys as 6.50% of MP, Lys/Met of 3.63, and the flow of digestible AA of 1096  
338 g/d. Regardless of the estimate, diet DDGY was predicted to be superior to the CTL diet, as it  
339 increased digestible AA flow and reduced the excessive Lys to Met ratio.

340           Although we did not attempt to determine the origin of the CP in DDGY, since there is  
341 no well-defined analytical method for this determination (Shurson, 2018), the provider of the  
342 product informed that it contained around 20% of DM as yeast derived co-product. Yeast  
343 protein was estimated to contribute to around 20% of total CP in DDG with solubles from corn  
344 fermentation (Han and Liu, 2020), although ethanol plants vary greatly in the proportion of  
345 condensed solubles blended with the grain fraction when manufacturing DDG (AAFCO,  
346 2017). Yeast cells are known to contain about 20% of the crude protein as nucleic acids (Reed  
347 and Nagodawithana, 1991). Brewer's yeast has lower ileal digestibility of all essential AA for  
348 swine compared to SBM (INRA, 2004). Yeast cells must be lysed to release the nutrients in  
349 their cell contents for digestion and absorption by the animal and excessive heating when  
350 drying can lead to the formation of Maillard products which can reduce AA availability  
351 (Almeida et al., 2013). The lower intestinal digestibility of the RUP in DDGY relative to SBM  
352 was an expected outcome, although it did not penalize the model predicted flow of absorbed  
353 AA in diet DDGY relative to CTL.

354           The positive effect of the DDGY diet on lactation performance was plausibly the result  
355 of greater and better absorbable AA supply. Based on the NRC (2001) estimate (Table 5), Leu  
356 was the AA with greatest increase on diet DDGY (+ 6.6 % of CTL). The Val and Met supplies  
357 were both increased by + 2.4% and Lys flow was reduced by – 2.7% relative to CTL. Previous  
358 studies have also detected increases in plasma Leu and Met concentrations with corn protein  
359 coproducts in the diet of dairy cows (Nichols et al., 1998; Liu et al., 2000; Paz and Kononoff,  
360 2014). Both Leu and Met have been classified as TOR-AA, due to their cell signaling role in  
361 stimulating protein synthesis through the mTOR pathway (Arriola-Apelo et al., 2014; Saxton  
362 et al., 2016; Yoder et al., 2020). Therefore, the trends for increased casein and protein yields

363 might have been brought about by greater supply of these two AA. Protein synthesis  
364 stimulation, both in mammary gland and other tissues, along with a better AA profile in  
365 metabolizable protein, may result in lower AA catabolism and urea synthesis in the liver. For  
366 instance, Mjoun et al. (2010b) and Paz and Kononoff (2014) found increased mammary  
367 arterio-difference of Lys when corn coproducts and soybean protein sources were combined  
368 in the diet. Additionally, Huang et al. (2021) found that Lys catabolism by the mammary  
369 glands was reduced when Leu and Ile availability were increased by jugular infusion of these  
370 amino acids. This potential lower AA catabolism, along with reduced RDP, would also  
371 contribute to the lower MUN and PUN for DDGY than CTL. Therefore, it is possible that the  
372 diversity in protein sources, such as SBM and DDGY, allows for a complementary AA profile  
373 and may elicit a higher efficiency in the use of absorbed AA for milk protein synthesis.

374         An interesting observation was the effect of the change in diet protein profile on the  
375 partitioning of the daily intake among periods of the day and on particle size sorting behaviors.  
376 Diet DDGY increased the proportion of daily intake in the afternoon. It was expected that the  
377 substitution of SBM with DDGY would affect the composition of feed particles < 8 mm, at  
378 similar diet particle size distribution, since both concentrates would not be retained on the  
379 middle and top screens of the Penn State separator. Sorting in favor of particles < 8 mm in the  
380 morning was increased by DDGY at the expense of particles greater than 8 mm. This sorting  
381 behavior may suggest that DDGY was more palatable than SBM, although such sorting  
382 behavior was not detected in the afternoon and night. Major differences in particle size sorting  
383 behavior were detected only for the feed available in the morning in our experiment.

384         The nature of the N sources may also be a factor on the partitioning of daily intake and  
385 particle size sorting behavior. The supplementation of dairy cows with urea and slow-release



386 urea in replacement to SBM increased PUN, reduced DMI, and increased the number of meals  
387 in the morning (Santos et al., 2011). Wilson et al. (1975) observed that the infusion of urea  
388 into the rumen reduced DMI as much as the inclusion in the diet, suggesting a systemic mode  
389 of action. A mechanism by which protein intake may interfere with eating behavior is through  
390 the net ATP production in the hepatic urea cycle that signals to the vagus nerve (Oba & Allen,  
391 2003). Even though none of these mechanisms were evaluated in this study, they suggest that  
392 there are connections between N metabolism and eating behavior in dairy cows. Apparently,  
393 changes in protein sources palatability or PUN could be related to changes in behavioral  
394 chewing, with no change in daily DMI.

### 395 CONCLUSIONS

396 The partial replacement of SBM by DDGY increased milk yield at similar DMI, having  
397 positive effect on feed efficiency. The intake of DOMI and rumen microbial yield did not  
398 differ. Diet DDGY reduced MUN and PUN and tended to increase the yields of milk protein  
399 and casein, suggesting reduced ruminal degradability of CP and increased supply of  
400 absorbable amino acids relative to CTL.

### 401 REFERENCES

- 402 AAFCO, 2017. Official Publication. Association of American Feed Control Officials,  
403 Champaign, IL.
- 404 Almeida, F. N., J. K. Htoo, J. Thomson, H. H. Stein. 2013. Amino acid digestibility of heat  
405 damaged distillers dried grains with solubles fed to pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 4:44-  
406 54. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-44>
- 407 AOAC International. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC International.  
408 Gaithersburg, MD.

- 409 AOAC International. 2002. Official Methods of Analysis. 16th ed. AOAC International.  
410 Gaithersburg, MD.
- 411 Arriola-Apelo, S. A., L. M. Singer, X. Y. Lin, M. L. McGilliard, N. R. St-Pierre, M. D.  
412 Hanigan. 2014. Isoleucine, leucine, methionine, and threonine effects on mammalian  
413 target of rapamycin signaling in mammary tissue. *J. Dairy Sci.*, 97:1047-1056.  
414 <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7348>
- 415 Belyea, R. L., K. D. Rausch, M. E. Tumbleson. 2004. Composition of corn and distillers  
416 dried grains with solubles from dry grind ethanol processing. *Bioresour. Technol.*,  
417 94:293-298. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.001>
- 418 Brown, W. E., B. J. Bradford. 2020. Effects of a high-protein corn product compared with soy  
419 and canola protein sources on nutrient digestibility and production responses in mid-  
420 lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 103:6233-6243. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17939>
- 422 Calsamiglia, S., M. D. Stern. 1995. A three-step in vitro procedure for estimating intestinal  
423 digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.*, 73:1459-1465.  
424 <https://doi.org/10.2527/1995.7351459x>
- 425 Chen, X. B., M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle  
426 based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details. *Int.*  
427 *Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett Research Institute, Aberdeen, United  
428 Kingdom.
- 429 Confederação Nacional da Agricultura. 2020. Previsão de safra de cana de açúcar. Accessed  
430 Jul. 29, 2020. <https://www.cnabrazil.org.br>

- 431 Correa, C. E. S., R. D. Shaver, M. N. Pereira, J. G. Lauer, K. Kohn. 2002. Relationship  
432 between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability J. Dairy Sci. 85:3008-  
433 3012. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74386-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74386-5)
- 434 Gargallo, S., S. Calsamiglia, A. Ferret. 2006. A modified three-step in vitro procedure to  
435 determine intestinal digestion of proteins. J. Anim. Sci, 84:2163-2167.  
436 <https://doi.org/10.2527/jas.2004-704>
- 437 Hall, M. B. 2009. Analysis of starch, including maltooligosaccharides in animal feeds: a  
438 comparison of methods and a recommended method for AOAC collaborative study. J.  
439 Assoc. Off. Anal. Chem. 92:42-49. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.42>
- 440 Han, J., K. Liu. 2010. Changes in composition and amino acid profile during dry grind  
441 ethanol processing from corn and estimation of yeast contribution toward DDGS  
442 proteins. J. Agric. Food Chem., 58:3430-3437. <https://doi.org/10.1021/jf9034833>
- 443 Huang, X., P. S. Yoder, I. A. M. A. Teixeira, M. D. Hanigan. 2021. Assessing amino acid  
444 uptake and metabolism in mammary glands of lactating dairy cows intravenously infused  
445 with methionine, lysine, and histidine or with leucine and isoleucine. J. Dairy Sci.,  
446 104:3032-3051. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18169>
- 447 INRA, in: Sauvant, D., J. M. Perez, G. Tran. 2004. Tables of composition and nutritional  
448 value of feed materials: pigs, poultry, cattle, sheep, goats, rabbits, horses and fish. 2<sup>nd</sup>  
449 rev. ed. Wageningen Academic Publishers. The Netherlands.
- 450 Kleinschmit, D. H., J. L. Anderson, D. J. Schingoethe, K. F. Kalscheur, A. R. Hippen. 2007.  
451 Ruminal and intestinal degradability of distillers grains plus solubles varies by source. J.  
452 Dairy Sci., 90:2909-2918. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-613>

- 453 Lee, Y. H., F. Ahmadi, D. Y. Choi, W. S. Kwak. 2016. In situ ruminal degradation  
454 characteristics of dry matter and crude protein from dried corn, high-protein corn, and  
455 wheat distillers grains. *J. Anim. Sci. Technol.*, 58:1-7. [https://doi.org/10.1186/s40781-](https://doi.org/10.1186/s40781-016-0115-3)  
456 [016-0115-3](https://doi.org/10.1186/s40781-016-0115-3)
- 457 Leonardi, C., L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length of alfalfa hay on  
458 selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:557–564.  
459 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73634-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73634-0)
- 460 Li, C., J. Q. Li, W. Z. Yang, K. A. Beauchemin .2012. Ruminal and intestinal amino acid  
461 digestion of distiller's grain vary with grain source and milling process. *Anim. Feed Sci.*  
462 *Technol.*, 175:121-130. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75089-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75089-2)
- 463 Liu, C., D. J. Schingoethe, G. A. Stegeman. 2000. Corn distillers grains versus a blend of  
464 protein supplements with or without ruminally protected amino acids for lactating cows.  
465 *J. Dairy Sci.*, 83:2075-2084. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)75089-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)75089-2)
- 466 Liu, K. S. 2011. Chemical composition of distillers grains, a review. *J. Agric. Food Chem.*,  
467 59:1508-1526. <https://doi.org/10.1021/jf103512z>
- 468 Lobos, N. E., M. A. Wattiaux, G. A. Broderick. 2021. Effect of rumen-protected lysine  
469 supplementation of diets based on corn protein fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*  
470 104:6620-6632. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19835>
- 471 Majoni, S., T. Wang, L. A. Johnson. 2011. Physical and chemical processes to enhance oil  
472 recovery from condensed corn distillers solubles. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88:425-434.  
473 <https://doi.org/10.1007/s11746-010-1681-z>

- 474 Maxin, G., D. R. Ouellet, H. Lapierre. 2013. Ruminant degradability of dry matter, crude  
475 protein, and amino acids in soybean meal, canola meal, corn, and wheat dried distillers  
476 grains. *J. Dairy Sci.*, 96:5151-5160. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6392>
- 477 Menezes, A. C. B., S. V. Filho, P. P. Rotta, S. A. Santos, M. V. C. Pacheco, B. C. Silva, P.  
478 Pucetti, H. M. Alhadas, E. Detman, J. S. Caton. 2017. Does microbial nitrogen  
479 contamination affect the estimation of crude protein degradability of concentrate feeds?.  
480 *J. Anim. Sci.* 95:4164-4171. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1699>
- 481 Mjoun, K., K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, D. J. Schingoethe. 2010a. Ruminant degradability  
482 and intestinal digestibility of protein and amino acids in soybean and corn distillers  
483 grains products. *J. Dairy Sci.*, 93:4144-4154. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2883>
- 484 Mjoun, K., K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, D. J. Schingoethe, D. E. Little. 2010b. Lactation  
485 performance and amino acid utilization of cows fed increasing amounts of reduced-fat  
486 dried distillers grains with solubles. *J. Dairy Sci.*, 93:288-303.  
487 <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2377>
- 488 Mullins, C. R., L. K., Mamedova, M. J. Brouk, C. E. Moore, H. B. Green, K. L. Perfield, J. F.  
489 Smith, J. P. Harner, B. J. Bradford. 2012. Effects of monensin on metabolic parameters,  
490 feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95:1323–1336.  
491 <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4744>
- 492 National Academies of Science Engineering and Medicine. NASEM. 2021. Nutrient  
493 Requirements of Dairy Cattle. 8th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- 494 Nichols, J. R., D. J. Schingoethe, H. A. Maiga, M. J. Brouk, M. S. Piepenbrink. 1998.  
495 Evaluation of corn distillers grains and ruminally protected lysine and methionine for

- 496 lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 81:482-491. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75600-0)  
497 [0302\(98\)75600-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75600-0)
- 498 NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington,  
499 DC.
- 500 Oba, M., M. S. Allen. 2003. Effects of intraruminal infusion of sodium, potassium, and  
501 ammonium on hypophagia from propionate in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 86:  
502 1398-1404. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73723-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73723-0)
- 503 Palowski, A., Z. Yang, J. Jang, T. Dado, P. E. Urriola, G. C. Shurson. 2021. Determination  
504 of in vitro dry matter, protein, and fiber digestibility and fermentability of novel corn  
505 coproducts for swine and ruminants. *Transl. Anim. Sci.*, 5(2), txab055.  
506 <https://doi.org/10.1093/tas/txab055>
- 507 Paz, H. A., P. J. Kononoff. 2014. Lactation responses and amino acid utilization of dairy cows  
508 fed low-fat distillers dried grains with solubles with or without rumen-protected lysine  
509 supplementation. *J. Dairy Sci.*, 97:6519-6530. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8315>
- 510 Reed, G. T. W. Nagodawithans. 1991. *Yeast technology*. 2<sup>nd</sup> ed. Avi Publishing, New York,  
511 NY.
- 512 Renewable Fuels Association. 2020. Monthly grain use for ethanol production. Accessed Jul.  
513 30, 2020. <https://ethanolrfa.org/statistics/>
- 514 Santos, J. F., G. S. Dias Júnior, L. L. Bitencourt, N. M. Lopes, S. Siécola Júnior, J. R. M.  
515 Silva, R. A. N. Pereira, M. N. Pereira. 2011. Response of lactation cows to partial  
516 replacement of soybean meal whit encapsulated urea. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,  
517 63:423-432. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000200021>

- 518 Saxton, R. A., K. E. Knockenhauer, R. L. Wolfson, L. Chantranupong, M. E. Pacold, T.  
519 Wang, T. U. Schwartz, D. M. Sabatini. 2016. Structural basis for leucine sensing by the  
520 Sestrin2-mTORC1 pathway. *Science*, 351:53-58.  
521 <https://doi.org/10.1126/science.add2087>
- 522 Shurson, G. C. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources,  
523 characteristics, animal responses, and quantification methods. *Anim. Feed Sci. Technol.*,  
524 235:60-76. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.010>
- 525 US Grain Council. 2012. A guide to distiller's dried grains with solubles (DDGS). 3<sup>a</sup> ed.  
526 Accessed Marc. 22, 2021 [http://www.grains.org/sites/default/files/ddgs-](http://www.grains.org/sites/default/files/ddgs-andbook/Complete)  
527 [andbook/Complete](http://www.grains.org/sites/default/files/ddgs-andbook/Complete)
- 528 Wilson, G., F. A. Martz, J. R. Campbell, B. A. Becker. 1975. Evaluation of factors  
529 responsible for reduced voluntary intake of urea diets for ruminants. *J. Anim. Sci.* 41:  
530 1431-1437. <https://doi.org/10.2527/jas1975.4151431x>
- 531 Yoder, P. S., X. Huang, I. A. Teixeira, J. P. Cant, M. D. Hanigan. 2020. Effects of jugular  
532 infused methionine, lysine, and histidine as a group or leucine and isoleucine as a group  
533 on production and metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 103:2387-2404.  
534 <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17082>
- 535 Yousef, M. K. 1985. *Stress Physiology in Livestock*. 1st ed. CRC Press Inc., Boca Raton,  
536 FL.

537

## TABLES AND FIGURES

538 **Table 1.** Composition of diets for treatments Control (CTL) and high protein distillers dried  
 539 grains with yeast (DDGY)

	CTL	DDGY
	% of dry matter	
Corn silage	40.8	40.5
Oat hay	4.7	4.8
Soybean meal	17.8	11.6
DDGY <sup>1</sup>		6.3
Whole cottonseeds	8.3	8.4
Finely ground corn rehydrated and ensiled	14.7	14.7
Citrus pulp	11.0	11.0
Limestone	0.8	0.8
Sodium bicarbonate	0.9	0.9
Magnesium oxide	0.2	0.2
Salt	0.2	0.2
Minerals and vitamins <sup>2</sup>	0.6	0.6
Crude protein (CP)	16.6	16.7
CP from FlexyPro		3.3
Neutral detergent fiber (NDF)	29.2	31.4
Forage NDF	26.0	25.9
Starch plus free glucose	26.6	26.9
Ash	6.0	5.8
Ether extract	4.3	4.2
Non-fiber carbohydrates <sup>3</sup>	41.7	39.8
	% of as-fed	
Dry matter	50.8	50.9
Feed particles > 19 mm <sup>4</sup>	9.7 ± 3.3	8.3 ± 2.8
Feed particles 8 - 19 mm	43.5 ± 2.2	43.4 ± 4.5
Feed particles < 8 mm	46.8 ± 3.6	48.3 ± 5.5

540 <sup>1</sup>FlexyPro. SJC Bioenergia, Quirinópolis, Brazil.

541 <sup>2</sup>200 g/kg Ca; 156 g/kg P; 30 g/kg Mg; 35 g/kg S; 150 mg/kg Co; 2,000 mg/kg Cu; 5,000 mg/kg  
 542 Mn; 11,900 mg/kg Zn; 82 mg/kg Se; 200 mg/kg I; 1,000 KUI/kg vit A; 220 KUI/kg vit D; 6.2  
 543 KUI/kg vit E.

544 <sup>3</sup>NFC: 100 – (CP + ether extract + ash + NDF).

545 <sup>4</sup>Orifice diameter of sieves of the Penn State Particle Separator. Mean ± SD of 12 TMR  
 546 samples.



547 **Table 2.** Nutrient composition of feedstuffs: Dry matter (DM), organic matter (OM), crude  
 548 protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), and starch + free glucose

	DM	OM	CP	NDF	Starch
	% of as-fed	% of dry matter			
Corn silage	31.1	96.7	8.2	46.9	28.0
Oat hay	90.0	94.3	6.2	73.9	5.6
Soybean meal	87.6	93.2	49.6	10.3	3.5
High protein distillers dried grains with yeast <sup>1</sup>	87.4	97.3	50.2	43.7	7.1
Whole cottonseeds	94.2	96.1	22.5	39.7	3.3
Finely ground corn rehydrated and ensiled	62.0	98.7	9.2	7.4	73.4
Citrus Pulp	84.1	94.2	7.8	18.1	7.5

549 <sup>1</sup>FlexyPro. SJC Bioenergia, Quirinópolis, Brazil.

550 **Table 3.** Amino acids composition of high protein distillers dried grains with  
 551 yeast (DDGY) and soybean meal

	DDGY	Soybean meal
	% of true protein	
Essential amino acids	43.81	45.86
Arginine	4.72	7.60
Histidine	2.98	2.74
Isoleucine	3.82	4.65
Leucine	11.84	7.79
Lysine	3.62	6.27
Methionine	2.06	1.41
Phenylalanine	5.15	5.26
Threonine	4.05	3.96
Valine	5.56	4.86
Tryptophan		1.33
Non-essential amino acids	56.19	54.15
Aspartic acid	7.22	11.74
Alanine	7.46	4.46
Cysteine + Cystine	2.06	1.52
Glutamic acid	17.58	18.01
Glycine	4.05	4.36
Proline	8.24	5.16
Serine	5.11	5.16
Tyrosine	4.48	3.75

552

553 **Table 4.** Kinetics of ruminal in situ degradation of crude protein (CP) and in vitro intestinal  
 554 digestibility of the rumen undegradable protein (RUP digest) of soybean meal (SBM. 49.0%  
 555 CP) and high protein distillers dried grains with yeast<sup>1</sup> (DDGY. 51.4% CP)

	SBM	FP	SEM	<i>P</i> -value
	% of CP			
Fraction A <sup>2</sup>	13.7	17.7	3.89	0.24
Fraction B <sup>3</sup>	83.0	43.5	2.84	< 0.01
Fraction C <sup>4</sup>	3.3	38.5	2.88	< 0.01
RDP 4 <sup>5</sup>	69.5	40.8	2.75	< 0.01
RDP 5	65.5	37.9	2.88	< 0.01
RDP 6	61.5	36.5	2.94	< 0.01
RDP 7	58.3	34.7	3.05	< 0.01
kd of B, <sup>6</sup> %/h	8.5	4.4	0.99	< 0.01
RUP digest, <sup>7</sup> % of RUP	63.3	48.0	0.47	< 0.01
RUP digest, <sup>8</sup> % of RUP	61.0	50.7	0.47	< 0.01

556 <sup>1</sup>FlexyPro. SJC Bioenergia, Quirinópolis, Brazil.

557 <sup>2</sup>Instantaneously degradable CP fraction.

558 <sup>3</sup>Slowly degradable CP fraction.

559 <sup>4</sup>Indigestible CP fraction.

560 <sup>5</sup>RDP = Rumens degradable protein: Fraction A + Fraction B × [kd/(kd + kp)]. kp = 4 to 7  
 561 %/h.

562 <sup>6</sup>Fractional degradation rate of fraction B.

563 <sup>7</sup>RUP digest of the 12 h rumen incubated residue.

564 <sup>8</sup>RUP digest of the 16 h rumen incubated residue.

565 **Table 5.** NRC (2001) dairy model predictions<sup>1</sup> for treatments control (CTL) and high protein  
 566 distillers dried grains with yeast (DDGY)

	CTL	DDGY
Rumen degradable protein (RDP), % of dry matter	10.5	9.8
Rumen undegradable protein (RUP), % of dry matter	6.0	6.9
RDP balance, g/d	102	-49
RUP balance, g/d	77	49
Metabolizable protein (MP) balance, g/d	52	31
MP - Bacterial, g/d	1223	1191
MP - RUP, g/d	916	989
MP - Endogenous, g/d	105	105
Digestible amino acids		
Arg, % of MP	4.82	4.64
His, % of MP	2.22	2.23
Ile, % of MP	4.94	4.84
Leu, % of MP	8.77	9.19
Lys, % of MP	6.61	6.31
Met, % of MP	1.85	1.88
Phe, % of MP	5.07	5.07
Thr, % of MP	4.89	4.85
Val, % of MP	5.48	5.51
Arg, g/d	108	106
His, g/d	50	51
Ile, g/d	111	110
Leu, g/d	197	210
Lys, g/d	148	144
Met, g/d	42	43
Phe, g/d	114	116
Thr, g/d	110	111
Val, g/d	123	126
Total essential amino acids, g/d	1002	1016
Lys/Met	3.57	3.35

567 <sup>1</sup>Predictions based on feed ingredient analysis, measured values for rumen undegradable and  
 568 degradable protein (in situ) and intestinal digestibility (in vitro) for SBM and FlexyPro, and  
 569 intake and lactation performance observed for each treatment during the experiment.

570 **Table 6.** Dry matter intake (DMI), lactation performance, milk urea-N (MUN), linear somatic  
 571 cell count (SCC), feed efficiency, body weight (BW), and body condition score (BCS) on  
 572 treatments control (CTL) and high protein distillers dried grains with yeast (DDGY)

	Treatments		SEM	<i>P</i> -value <sup>2</sup>		
	Control	DDGY		Treat	Time	Treat×Time
	kg/d					
DMI	22.3	22.3	0.29	0.55	< 0.01	0.96
Milk	31.3	32.2	0.31	< 0.01	< 0.01	0.99
ECM <sup>2</sup>	29.9	30.6	0.48	0.10	< 0.01	0.79
Fat	1.147	1.171	0.0157	0.21	< 0.01	0.75
Protein	1.005	1.039	0.0182	0.10	< 0.01	0.93
Casein	0.779	0.806	0.0134	0.09	< 0.01	0.92
Lactose	1.442	1.477	0.0390	0.44	< 0.01	0.91
Solids	3.791	3.896	0.0890	0.33	< 0.01	0.88
	%					
Fat	3.57	3.58	0.035	0.91	0.06	0.63
Protein	3.22	3.25	0.017	0.23	< 0.01	0.77
Casein	2.50	2.52	0.015	0.44	< 0.01	0.77
Lactose	4.58	4.55	0.023	0.33	< 0.01	0.66
Solids	12.1	12.1	0.036	0.78	0.19	0.52
MUN, mg/dL	17.1	14.1	0.35	< 0.01	< 0.01	0.43
SCC, <sup>3</sup> 0 to 9	3.19	3.60	0.315	0.28	< 0.01	0.42
Milk/DMI	1.42	1.48	0.024	< 0.01	< 0.01	0.74
ECM/DMI	1.33	1.40	0.025	0.02	< 0.01	0.72
BW, kg	660	663	2.3	0.49	< 0.01	0.76
BCS, 1 to 5	3.06	3.10	0.051	0.51	< 0.01	0.16

573 <sup>1</sup>*P*-value for the effects of treatment (Treat), time (day or week), and the interaction between  
 574 Treat and time.

575 <sup>2</sup>Energy-corrected milk.

576 <sup>3</sup>Equivalency of the linear scores: 3.18 = 114,000 cells/mL and 3.52 = 152,000 cells/mL.

577 **Table 7.** Total tract apparent digestibility (D) of dry matter (DM), organic matter (OM), crude  
 578 protein (CP), neutral detergent fiber (NDF), starch + free glucose (Starch), and non-NDF OM,  
 579 digestible OM intake (DOMI), urinary allantoin, and plasma glucose for treatments Control  
 580 (CTL) and high protein distillers dried grains with yeast (DDGY)

	CTL	DDGY	SEM	<i>P</i> -value
D DM, % of intake	61.4	66.1	2.81	0.16
D OM, % of intake	63.8	68.0	2.62	0.17
D CP, % of intake	68.3	68.6	2.68	0.93
D NDF, % of intake	41.2	48.3	3.22	0.12
D Starch, % of intake	90.5	91.3	0.95	0.52
D non-NDF OM, % of intake	80.9	80.7	1.35	0.87
DOMI, kg/d	13.4	13.7	0.71	0.72
Allantoin, mmol/d	338	316	32.1	0.62
Allantoin/DOMI, mmol/kg	26.6	23.4	2.60	0.38
Plasma glucose, <sup>1</sup> mg/dL	57.2	57.9	1.07	0.61

581 <sup>1</sup>*P* < 0.01 for week (2, 4, 6, 8) and *P* = 0.58 for the interaction between treatment and week.

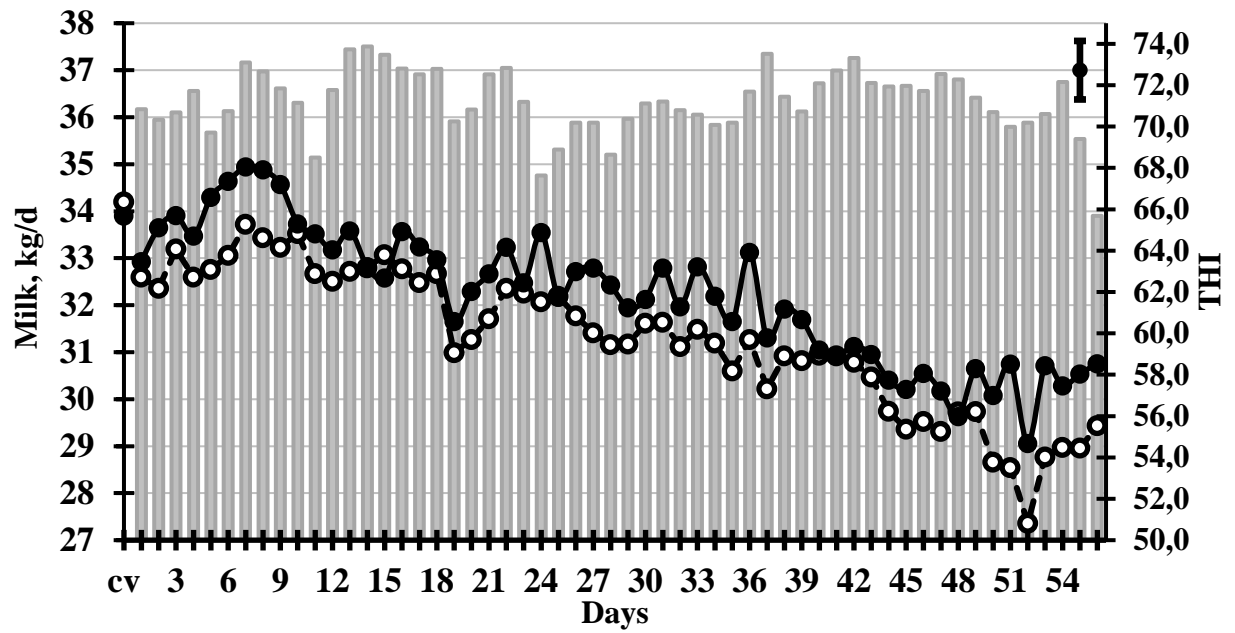
582 **Table 8.** Chewing behavior, proportion of intake in periods of the day and feed sorting behavior  
 583 on treatments control (CTL) and high protein distillers dried grains with yeast (DDGY)

	CTL	DDGY	SEM	<i>P</i> -value
Eating, min/d	299	272	12.9	0.09
Rumination, min/d	458	463	18.6	0.87
Chewing, <sup>1</sup> min/d	758	735	25.4	0.41
Eating, min/kg dry matter intake	13.6	12.8	0.68	0.37
Rumination, min/kg dry matter intake	20.8	21.6	0.95	0.57
Chewing, min/kg dry matter intake	34.4	34.3	1.40	0.97
Meal size, kg of dry matter/meal	2.8	2.8	0.15	0.99
First meal duration, min	60	53	5.4	0.33
Meal duration, min	38.0	36.0	2.2	0.43
Meals/d	8.0	8.0	0.36	0.80
0700 to 1300 h, % of daily intake	38.1	37.4	0.03	0.79
1300 to 1900 h, % of daily intake	37.6	44.0	0.02	0.04
1900 to 0700 h, % of daily intake	23.9	20.5	0.02	0.18
		Observed/Predicted, <sup>2</sup> %		
0700 to 1300 h				
> 19 mm	93.7	69.3	10.44	0.03
> 8 mm and < 19 mm	104.9	88.3	3.60	< 0.01
< 8 mm	100.9	120.0	3.59	< 0.01
1300 to 1900 h				
> 19 mm	68.9	63.9	7.24	0.61
> 8 mm and < 19 mm	96.4	99.5	1.32	0.15
< 8 mm	113.2	112.6	2.17	0.85
1900 to 0700 h				
> 19 mm	80.7	80.0	9.44	0.96
> 8 mm and < 19 mm	99.2	109.1	4.36	0.12
< 8 mm	110.7	105.9	4.22	0.43
Daily orts, <sup>3</sup> % of offered	11.0	12.2	0.01	0.46

584 <sup>1</sup>Chewing = Eating + Rumination.

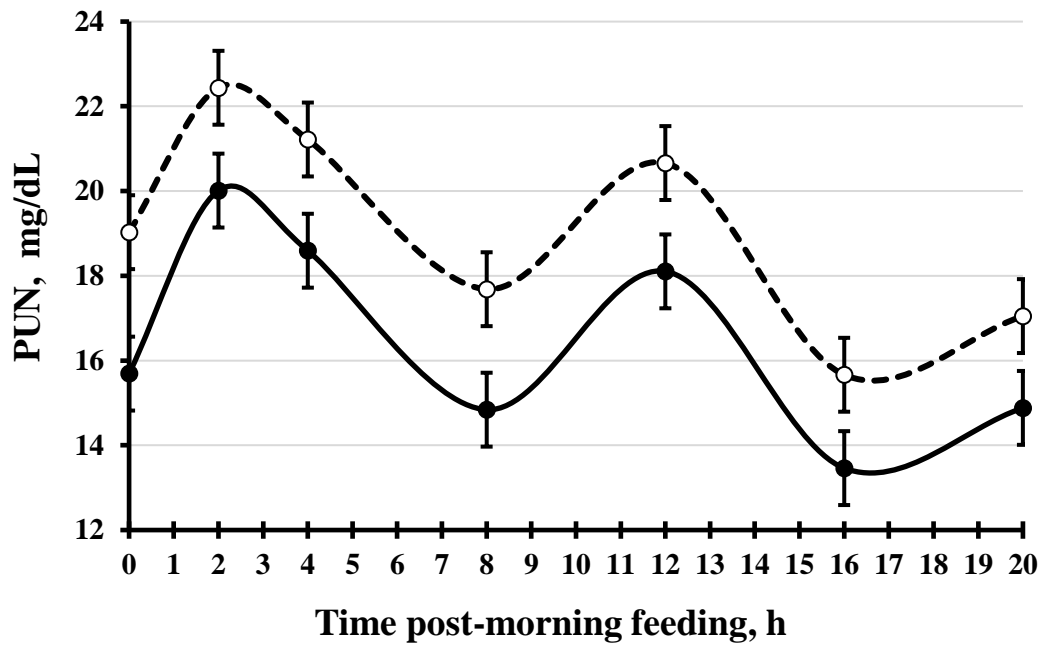
585 <sup>2</sup> < 100% = rejection, > 100% = preferential intake, 100% = no selection. Sieves of the Penn  
 586 State Particle Separator.

587 <sup>3</sup>Daily orts = (Orts 0700 h/Offered TMR per day) × 100.



**Figure 1.** Milk yield on treatments Control (---○---) and high protein distillers dried grains with yeast (—●—) and daily temperature-humidity index (THI, bars).  $P = 0.01$  for the effect of treatment,  $P < 0.01$  for the effect of day, and  $P = 0.99$  for the interaction of treatment and day. cv = covariate ( $P = 0.71$ ).





**Figure 2.** Plasma urea nitrogen (PUN) over time on treatments Control (---○---) and high protein distillers dried grains with yeast (—●—). Cows had access to a new batch of feed at times 0 (0700 h, after morning milking) and 7.5 (1430 h, after midday milking).  $P < 0.01$  for the effect of treatment,  $P < 0.01$  for the effect of hour, and  $P = 0.84$  for the interaction of treatment and hour. Mean  $\pm$  SEM: Control =  $19.1 \pm 0.78$  and high protein distillers dried grains with yeast =  $16.5 \pm 0.78$ .