

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**FONTES PROTEICAS DE ORIGEM VEGETAL SOBRE O
PROCESSO DE EXTRUSÃO E A DIGESTIBILIDADE
APARENTE DE DIETAS PARA CÃES**

Francine Mendes Peres
Zootecnista

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FONTES PROTEICAS DE ORIGEM VEGETAL SOBRE O
PROCESSO DE EXTRUSÃO E A DIGESTIBILIDADE
APARENTE DE DIETAS PARA CÃES**

Francine Mendes Peres

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

Co-orientadora: Profa. Dra. Thaila Cristina Putarov

**Dissertação apresentada à Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias
Unesp, Campus de Jaboticabal, como
parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Zootecnia**

2018

Peres, Francine Mendes
P437e Efeito de diferentes fontes proteicas de origem vegetal sobre o
processo de extrusão e a digestibilidade aparente de dietas para cães
/ Francine Mendes Peres. – – Jaboticabal, 2018
xv, 57 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
Coorientadora: Thaila Cristina Putarov
Banca examinadora: Ananda Portella Félix, Fabiano Cesar Sá
Bibliografia

1. Concentrado proteico de soja. 2. Isolado proteico de soja. 3.
Propriedades funcionais. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636..084:636.7

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Jaboticabal/SP - Karina Gimenes Fernandes - CRB 8/7418



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: FONTES PROTEICAS DE ORIGEM VEGETAL SOBRE O PROCESSO DE EXTRUSÃO E A DIGESTIBILIDADE APARENTE DE DIETAS PARA CÃES

AUTORA: FRANCINE MENDES PERES

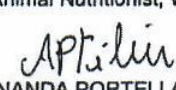
ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI

COORDINADORA: THAILA CRISTINA PUTAROV

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador Dr. FABIANO CESAR SÁ
Companion Animal Nutritionist, Wenger Service Team / Valinhos/SP


Profa. Dra. ANANDA PORTELLA FÉLIX
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal do Paraná / Curitiba/PR

Jaboticabal, 18 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

FRANCINE MENDES PERES filha de Carlos Sales Peres e Vera Lúcia Mendes Peres, nasceu em 13 de agosto de 1990, em São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil. Em 2009, ingressou na graduação em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal e graduou-se em julho de 2015. Foi bolsista da CAPES durante período sanduíche na Universidade Montpellier SupAgro - FR (2013-2014). Realizou estágio na Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - FR na área nutrição de cães e gatos (2014). Em março de 2016, iniciou o mestrado em Zootecnia pela mesma instituição, onde obteve bolsa pelo CNPq sob a supervisão do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi.

“A vida virtuosa é aquela inspirada pelo
amor e guiada pelo conhecimento”
(Bertrand Russell)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e a minha irmã pelas oportunidades que me levaram até esse momento, pela confiança e pelo amor. Aos meus amigos por compartilharem seu amor e suas experiências comigo, o que me permite ser uma pessoa melhor a cada dia. Ao Professor Aulus Cavalieri Carciofi e toda sua equipe pelos ensinamentos e por todas as oportunidades que me deu. A todos aqueles que passaram por mim e que alimentaram a minha alma de sentimentos bons, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Vera e Carlos, por todo amor e confiança. Por sempre me apoiarem e me incentivarem. Por passarem privações para me dar o melhor possível. Por compreenderem minhas ausências.

Ao Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi e à todos os pós graduandos, estagiários e funcionários que formam a equipe do LabNutri, pelos ensinamentos, paciência e companheirismo. Agradeço por sermos uma equipe unida, sempre capaz de se divertir mesmo em momentos difíceis.

Aos meus amigos com os quais compartilhei ótimos momentos durante todos esses anos. Agradeço em especial à Mayara, Camila, Peterson, Bolo, Lisa e à república Madalena e agregados por se fazerem sempre presentes, por todos os momentos de descontração e pelas diversas reflexões sobre a vida.

Ao Gustavo Rezende Machado, pelo carinho, respeito, apoio e constante ensinamento.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, pela infraestrutura e pelo ensino, por me fornecerem uma formação acadêmica de excelente qualidade e de oportunidades.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa de estudo (132888/2016-5), sem a qual eu não teria condições de realizar o mestrado.

À Archer Daniels Midland Company - ADM, pelo suporte financeiro para execução desta pesquisa e a Melissa Maionchi de Oliveira pela contribuição técnica e pela paciência..

À Affinity Petcare, pelo apoio financeiro e técnico ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal.

À Manzoni pela doação da extrusora (modelo Mex-250), que possibilitou o desenvolvimento desse estudo.

SUMÁRIO

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	x
LISTAS DE ABREVIATURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xiv
CAPITULO 1 – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Características e processo de obtenção do concentrado proteico de soja e do isolado proteico de soja.....	2
2.2. Características e processo de obtenção do glúten de milho 60%.....	4
2.3. Características e processo de obtenção da farinha de vísceras de frango.....	6
2.4. Comportamento dos ingredientes proteicos de origem vegetal durante o processo de extrusão.....	7
2.5. Uso de proteínas de origem vegetal na alimentação de cães.....	10
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	12
4. REFERENCIAS.....	12
 CAPÍTULO 2 - Vegetable protein sources on extrusion parameters and digestibility of dog diets.....	 17
INTRODUCTION	21
MATERIAL AND METHODS.....	22
RESULTS	27
DISCUSSION.....	30
CONCLUSION	34
LITERATURE CITED	34

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **“Características reológicas, macroestrutura dos extrusados e digestibilidade de alimentos para cães formulados com proteína concentrada de soja”**, protocolo nº 6.184/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 04 de maio de 2016.

Vigência do Projeto	11/06/2016 a 02/07/2016
Espécie / Linhagem	Canina / Beagle
Nº de animais	30
Peso / Idade	12kg / 4 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Animais do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada" – Unesp Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de maio de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
 Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
 Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
 tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

FONTES PROTEICAS DE ORIGEM VEGETAL SOBRE O PROCESSO DE EXTRUSÃO E A DIGESTIBILIDADE APARENTE DE DIETAS PARA CÃES

RESUMO – O presente estudo avaliou a substituição da fonte proteica farinha de vísceras de frango (FVF) por diferentes inclusões de concentrado proteico de soja (CPS), isolado proteico de soja (IPS) e glúten de milho 60% (GM) sobre as características de extrusão, macroestrutura dos kibbles e digestibilidade dos nutrientes em alimentos para cães. Dois estudos foram realizados, o primeiro avaliou os efeitos dessas matérias primas sobre o processo de extrusão e a formatação e características dos kibbles. O segundo experimento utilizou cães para avaliar a digestibilidade de dietas contendo as fontes proteicas do estudo. O primeiro estudo seguiu delineamento inteiramente casualizado com 10 tratamentos (dietas), a dieta de controle com apenas FVF e 9 dietas teste formuladas pela substituição de 20%, 40% e 60% da proteína da dieta por CPS, IPS ou GM. O segundo estudo seguiu delineamento inteiramente casualizado com quatro dietas e seis animais por dieta, totalizando 24 cães. As dietas selecionadas para o segundo estudo foram: a dieta FVF e as dietas com os maiores teores de substituição da proteína da dieta pelas fontes de origem vegetal: CPS60%; IPS60% e GM60%. No primeiro estudo, quando diferenças foram detectadas pelo teste F da ANOVA, os efeitos dos níveis de substituição de cada ingrediente proteico foram comparados por contrastes polinomiais. No segundo estudo, quando diferenças foram detectadas na ANOVA, as comparações múltiplas das médias foram realizadas pelo teste de Tukey. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos. Com base nos resultados observados, devido as propriedades funcionais das proteínas da soja, a inclusão crescente de CPS promoveu aumento linear do desenvolvimento de viscosidade e da transferência de energia mecânica específica (EME), que aumentou de 17.1 kW-h/ton para FVF para 24.9 kW-h/ton com 60% de substituição da proteína da dieta por CPS ($P < 0.001$), e foi em média 30% superior quando comparado ao IPS e 40% quando comparado ao GM ($P < 0.001$). O IPS transferiu EME à massa de forma quadrática ($P < 0.001$), contribuindo com o processo de extrusão apenas a partir da substituição de 40% da proteína da dieta por IPS, provavelmente devido ao seu intenso tratamento industrial o que pode ter reduzido suas propriedades funcionais. A inclusão de GM não favoreceu o processo de extrusão. O CPS e IPS apresentaram elevada digestibilidade da proteína em cães e semelhantes ($P < 0.001$) a dieta FVF, de 90.6%, 90.9% e 89.0%, respectivamente. A digestibilidade da proteína no tratamento GM demonstrou-se superior a FVF (91.8%; $P < 0.001$). Os resultados encontrados para características das fezes indicam que o CPS ainda contém carboidratos fermentáveis que, quando comparado aos demais tratamentos, reduziram o pH fecal em 8% e aumentaram a umidade fecal em 20% ($P < 0.001$). Em conclusão, os tratamentos contendo CPS e IPS resultaram em aumento da aplicação de EME, da gelatinização do amido e da expansão dos kibbles. As fontes proteicas vegetais CPS, IPS e GM tiveram alta digestibilidade da proteína bruta.

Palavras chave: concentrado proteico de soja, farinha de vísceras de frango, glúten de milho, isolado proteico de soja, propriedades funcionais.

VEGETABLE PROTEIN SOURCES ON EXTRUSION PARAMETERS AND DIGESTIBILITY OF DOG DIETS

ABSTRACT - The present study evaluated the substitution of poultry by-product meal (PBM) by different inclusions of soy protein concentrate (CPS), soy protein isolate (SPI) and corn gluten meal 60 (GM) on the extrusion characteristics, kibble macrostructure and apparent digestibility of dog foods. Two studies were conducted, the first evaluated the raw materials effects on extrusion process and kibble formation and the second experiment used dogs to evaluate the digestibility of diets containing the protein sources under study. The first study followed a completely randomized design with 10 treatments (diets), a control diet with only PBM as the protein source was formulated and 9 test diets formulated by the replacement of 20%, 40% or 60% of the dietary protein by SPC, SPI, or GM. The second study followed a completely randomized design with four diets and six animals per diet, totaling 24 dogs. The diets selected for the second study were: the PBM diet and the diets with the greater substitution of dietary protein by vegetable protein sources: SPC60%; SPI60%; GM60%. For the first study, when differences were detected by the F test, the effects of the inclusion levels of each protein ingredient were compared by polynomial contrasts. For the second study, when significant differences were detected with ANOVA F tests, multiple comparisons of the means were performed using the Tukey test. Based on the observed results, due to the functional properties of the soybean proteins, an increasing inclusion of SPC promoted a linear increase in viscosity development and specific mechanical energy transfer (SME), which increased from 17.1 kW-h/ton for PBM to 24.9 kW-h/ton with 60% of replacement of the dietary protein by SPC ($P<0.001$), and was 30% higher when compared to SPI and 40% higher when compared to GM ($P<0.001$). The SPI transferred SME to the mass in a quadratic form ($P<0.001$), contributing to the extrusion process above of 40% replacement of the diet protein by SPI, probably due to its intense industrial treatment which may have reduced its functional properties. The inclusion of GM did not favor the extrusion process. SPC and SPI showed high protein digestibility for dogs, similar to PBM diet ($P<0.001$), with values of 90.6%, 90.9% and 89.0%, respectively. The protein digestibility of GM treatment was superior to PBM (91.8%; $P<0.001$). The results found for faeces characteristics indicate that SPC still contains fermentable carbohydrates which, when compared to other treatments, lower fecal pH by 8% and increased fecal moisture by 20% ($P<0.001$). In conclusion, the treatments containing SPC and SPI promoted an increased application of SME, starch gelatinization and kibble expansion. The vegetable protein sources SPC, SPI and GM had high digestibility of crude protein.

Key words: corn gluten meal, functional properties, poultry by-product meal, soy protein concentrate, soy protein isolate.

LISTAS DE ABREVIATURAS

CAPITULO 1

CHO – Carboidratos

CPS – Concentrado proteico de soja

EE – Extrato etéreo

FVF – Farinha de vísceras de frango

GM – Glúten de milho 60%

IPS – Isolado proteico de soja

N – Nitrogênio

PB – Proteína bruta

IDP – Índice de dispersibilidade da proteína

CAPITULO 2

CTTAD - Coefficient of total tract apparent digestibility

CF – Crude fat

CP – Crude protein

DM – Dry matter

GM - Corn gluten meal 60

SPI - Soy protein isolate

OM – Organic matter

PBM - Poultry by-product meal

SEM - Standard error of the mean

SME - specific mechanical energy

SPC - Soy protein concentrate

LISTA DE TABELAS

Table 1. Chemical composition and amino acid profile of protein sources used in the study (g/100g of DM).....	43
Table 2. Ingredient composition (% as-fed basis) of the experimental diets for dogs with different inclusions of protein sources.	44
Table 3. Chemical composition of extruded diets for dogs with different protein sources. Uncoated product, values on dry matter basis.....	46
Table 4. Processing parameters, kibble macrostructure traits, starch gelatinization and in vitro digestibility of extruded dog diets with different inclusions of Soy Protein Concentrate.....	47
Table 5. Processing parameters, kibble macrostructure traits, starch gelatinization and in vitro digestibility of extruded dog diets with different inclusions of Soybean Protein Isolate (SPI).	50
Table 6. Processing parameters, kibble macrostructure traits, starch gelatinization and in vitro digestibility of extruded dog diets with different inclusions of Corn Gluten Meal.	53
Table 7. Effects of different vegetable protein sources on the extrusion parameters and kibbles macrostructure of dog diets. Results of orthogonal polynomial contrasts of three inclusion amounts of each protein source.	54
Table 8. Chemical composition of the extruded diets for dogs with different protein sources. Composition of the finished product, after coating with poultry fat and palatant. Values on dry matter basis.	55
Table 9. Nutrient intake, coefficients of total tract apparent digestibility and metabolizable energy of extruded diets for dogs with different protein sources.	56
Table 10. Feces and urine production and characteristics of dogs fed extruded diets with different protein sources.	57

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1

Figura 1. Fluxograma do processo de obtenção dos derivados da soja - Adaptado de Wang (2004).	3
Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção dos derivados do milho - Adaptado de Geraldi (2012).	5
Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção de farinha de vísceras de aves. Adaptado de ABINPET (2017).	6

CAPITULO 2

Figure 1. Specific mechanical energy as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Concentrate: $y = 0.146x + 17.075$; $r^2 = 0.95$; $P < 0.0001$	48
Figure 2. Bulk density as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Concentrate : $y = 0.0208x^2 - 2.9451x + 422.41$; $r^2 = 0.95$; $P < 0.001$	48
Figure 3. Starch gelatinization as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Concentrate : $y = 0.1705x + 80.476$; $r^2 = 0.75$; $P = 0.0003$	49
Figure 4. Specific mechanical energy as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Isolate: $y = 0.0046x^2 - 0.1721x + 17.048$; $r^2 = 0.88$; $P < 0.0001$	51
Figure 5. Bulk density as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Isolate : $y = - 0.6266x + 414.95$; $r^2 = 0.66$; $P = 0.0003$	51
Figure 6. Starch gelatinization as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Isolate : $y = 0.0954x + 78.054$; $r^2 = 0.51$; $P = 0.0089$	52

CAPITULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o 2º maior país do mundo em população de cães e gatos (52,2 milhões de cães e 22,1 milhões de gatos) posicionando-se atrás apenas dos Estados Unidos. O setor pet faturou R\$19 bilhões em 2016, crescimento de 5,7% em relação a 2015, sendo 67,6% desse faturamento devido ao segmento de alimentos para animais de estimação. O crescimento do poder aquisitivo da população brasileira gera um aumento na demanda de alimentos industrializados de melhor qualidade, processo denominado *premiunização*. Dessa forma, o crescimento do mercado de *pet food* tem incentivado pesquisas para caracterizar melhor os ingredientes empregados. Os ingredientes proteicos encarecem as formulações das rações, especialmente quando selecionados com base no teor de proteína, digestibilidade e perfil em aminoácidos essenciais.

Alguns ingredientes proteicos de origem animal possuem excesso de matéria mineral, o que leva à diminuição da digestibilidade do alimento, provoca o ressecamento das fezes e eleva o conteúdo de cálcio, fósforo e magnésio do alimento, dificultando a formulação de dietas equilibradas. Devido a estes fatores, é prática comum em alimentos para cães e gatos, usar combinações de ingredientes para se obter adequado equilíbrio de aminoácidos, energia, gordura, minerais e vitaminas. Além de poder facilitar a formulação, as proteínas de origem vegetal também são incorporadas aos alimentos para animais de companhia devido às suas propriedades funcionais dentro do processo de produção. Essa funcionalidade é importante, pois um fator limitante para a inclusão de altos níveis de proteína nas dietas é a dificuldade de se processar alimento com elevada inclusão de farinhas de origem animal nos equipamentos de extrusão de rosca simples, os mais representados na indústria pet food.

Dentre esses ingredientes, destacam-se os derivados de soja e milho, devido à sua disponibilidade comercial constante, qualidade nutricional estável e bom perfil de aminoácidos, com destaque para os teores de fenilalanina e, nos grãos de soja, de triptofano. Adicionalmente, o Brasil é o segundo maior produtor de soja e o terceiro maior produtor de milho do mundo, com grande potencial de produção destas matérias primas especializadas. Dessa forma, esse estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da substituição da fonte proteica farinha de vísceras de

frango pelas fontes de proteína de origem vegetal concentrado proteico de soja, isolado proteico de soja e glúten de milho 60 sobre as características de extrusão, macroestrutura dos *kibbles* e digestibilidade aparente dos nutrientes em alimentos para cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Características e processo de obtenção do concentrado proteico de soja e do isolado proteico de soja

O grão de soja é um ingrediente amplamente utilizado em dietas para animais, possui cerca de 40% de proteína bruta (PB), 18% de extrato etéreo (EE) e 30% de carboidratos (CHO; 15% insolúveis e 15% solúveis) (Hymowitz et al., 1972; Silva et al., 2006). Em alimentos para cães e gatos, o farelo de soja (45% PB, 2% EE, 38% CHO) (Butolo, 2010) é o derivado mais utilizado, geralmente com o objetivo de baratear o custo da formula. Porém, recentemente, o concentrado proteico de soja (CPS) e o isolado proteico de soja (IPS) passaram a ser opções pois apresentam bom perfil de aminoácidos (JACOB et al, 1996) e boa digestibilidade de proteínas e energia em cães (Wiernusz et al., 1995). O CPS possui 65% de PB, 2% de EE e 20% de CHO (maioria insolúveis), enquanto que o IPS possui 85% de PB, 4% de EE e menos que 1% de CHO (Johnston et al., 2015).

Segundo Wang (2004), para a obtenção do CPS e do IPS, os grãos de soja inicialmente passam por rolos quebradores que separam a casca do grão, em seguida a casca é moída e tostada, podendo ser comercializada ou reincorporada ao farelo de soja (Figura 1). A soja descascada é então condicionada (adição de temperatura e umidade, por meio de vapor) e, em seguida, sofre processo de laminação, criando-se folhas finas dos grãos de soja. Essa soja laminada passa pelo processo de extração de óleo por meio de lavagem com hexano. O resultado desse processo é comercializado como óleo bruto ou óleo refinado de soja. Os flocos, após retirada do solvente e secagem, são moídos para produzir o CPS ou IPS ou, ainda, proteína texturizada de soja. O CPS é obtido após lavagem em etanol (40°C, 40 min) para remoção de carboidratos solúveis por centrifugação (15°C, 30 min), extraindo grande parte dos açúcares solúveis não digestíveis como rafinose e estaquiose. Por fim, o CPS é obtido após evaporação do etanol (40°C, 12h) e secagem em forno a

vácuo (50°C, 8h). Já o IPS é obtido a partir da solubilização da fração de proteína usando hidróxido de sódio ou potássio (pH 8,5 a 45°C) e, em seguida a solução de proteína é separada da fração insolúvel por centrifugação e acidificada a pH 4,5 com ácido clorídrico ou fosfórico a 20°C. Por fim, a obtenção do IPS ocorre após uma segunda centrifugação, seguida da neutralização (pH 6,5 a 7,0) e secagem por liofilização.

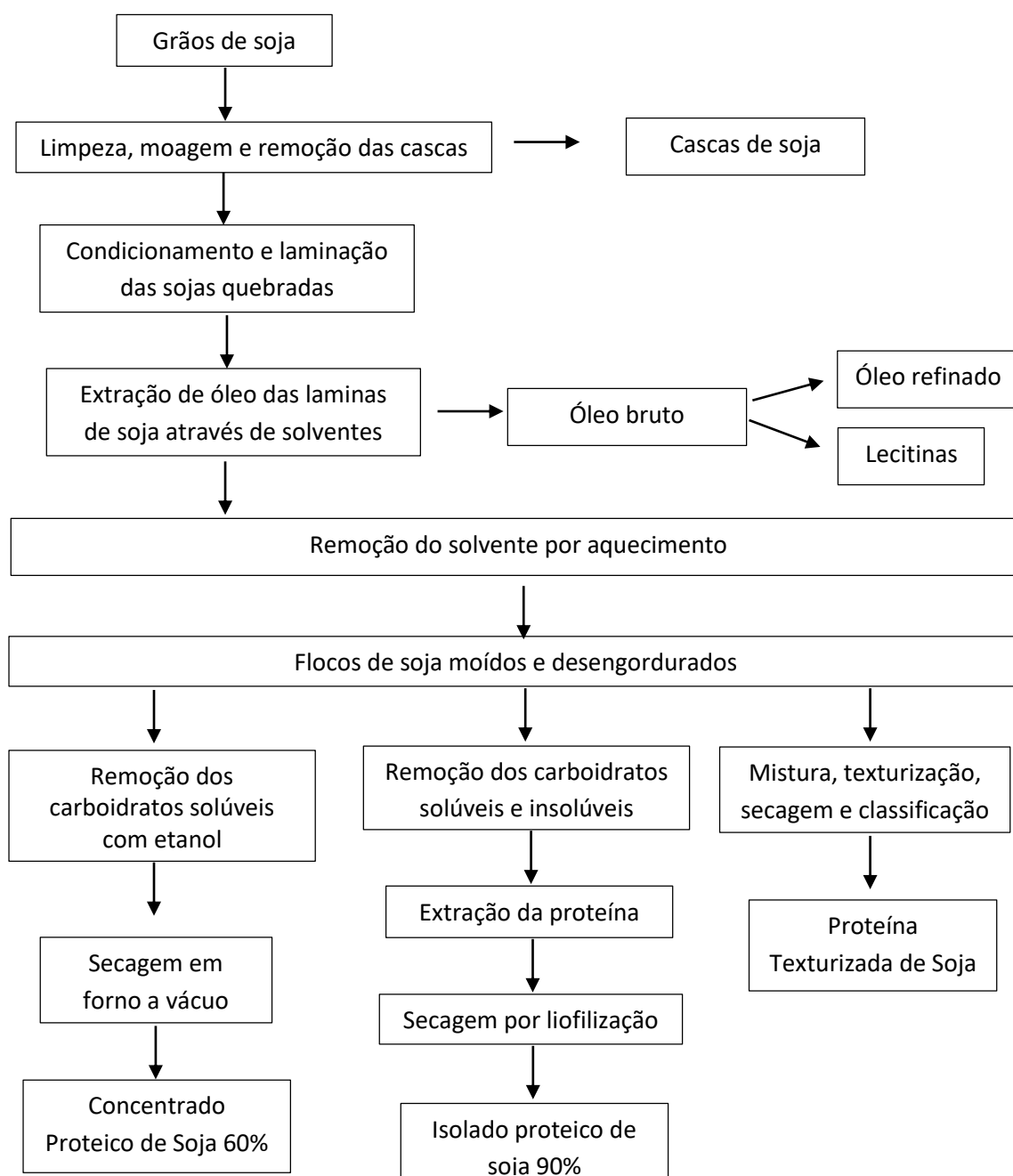


Figura 1. Fluxograma do processo de obtenção dos derivados da soja - Adaptado de Wang (2004).

2.2. Características e processo de obtenção do glúten de milho 60%

O milho é o principal ingrediente utilizado na dieta dos animais, possui em média 8% PB, 4% EE e 72% de amido (Carvalho e Nakagawa, 2000). O farelo de glúten de milho 60 é um ingrediente com alto teor de proteína (60%), baixo amido (17%) e baixa gordura (2,5%) (Valadares e Filho, 2006). Possui bom perfil de aminoácidos, sobretudo nos aminoácidos metionina e arginina (Rausch e Belyea, 2006) e boa digestibilidade em cães (Yamka et al., 2004; Carciofi et al, 2006). Em dietas para gatos, é uma das principais fontes de proteína vegetal, auxiliando na redução do pH da urina, contribuindo para a saúde do trato urinário (Funaba et al., 2002).

Segundo Kent e Evers (1983), o glúten de milho 60 (GM) é um produto obtido a partir do processamento do milho por via úmida. Após a limpeza dos grãos, o milho grão é levado para tanques acoplados com maceradores para receberem banho contínuo em uma solução contendo água, lactobacilos e dióxido de enxofre (SO_2). No processo de separação do amido e das proteínas, o SO_2 diluído reage com a água (H_2O), formando o ácido sulfuroso (H_2SO_3) que evita a germinação do grão e controla a fermentação. Os nutrientes presentes no grão são então liberados para a solução aquosa que será drenada e concentrada através de peneiras e centrifugação. Os grãos de milho recebem também banho de hipoclorito para separação do gérmen. Após essas etapas obtêm-se duas soluções concentradas, a solução que contém o gérmen será processada para obtenção de óleo, já a solução que é composta por amido, proteína e fibra passa por combinação de tratamentos químico (enzimático) e físico (centrifugação) para remoção do amido e concentração da proteína, respectivamente. Essa solução posteriormente passa por secagem e moagem para enfim constituir o farelo de glúten de milho 60% (Figura 2).

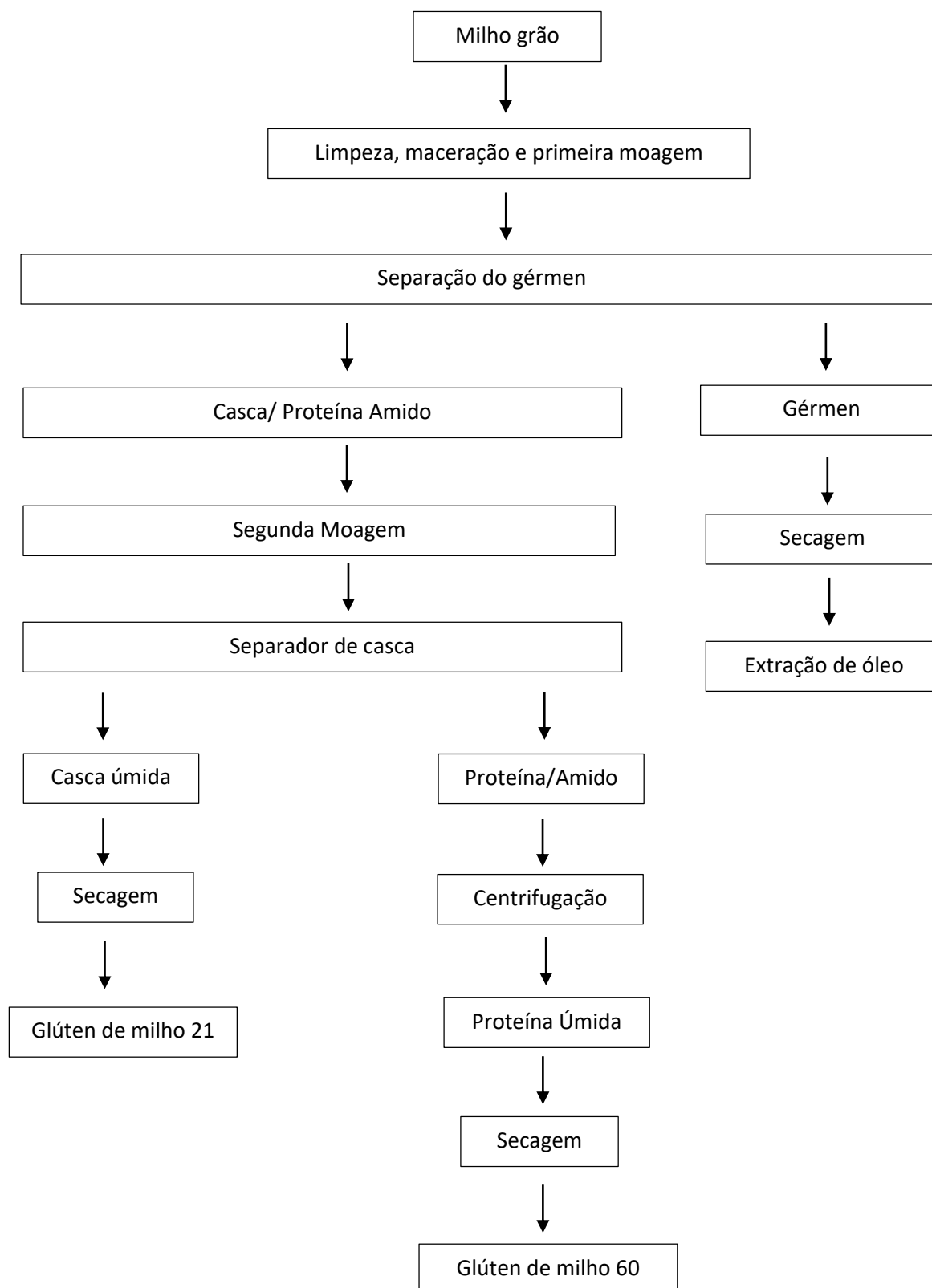


Figura 2. Fluxograma do processo de obtenção dos derivados do milho - Adaptado de Geraldí (2012).

2.3. Características e processo de obtenção da farinha de vísceras de frango

A farinha de vísceras de frango (FVF) é a fonte proteica de origem animal mais comum em dietas secas para cães, porém, informações sobre a composição química e a digestibilidade de seus nutrientes indicam que este é um produto extremamente variável (Johnson et al., 1998, Carciofi, 2008; Kawauchi, 2012). A composição química média da FVF inclui 58% de PB, 10% de EE e 13% de matéria mineral (Butolo, 2010), embora mais recentemente produtos com até 70% de PB estejam disponíveis no mercado, oriundos da seleção de partes não aproveitadas do frango (Kawauchi, 2012).

A FVF é composta de subprodutos provenientes do abate de aves que não são desejados na alimentação humana, composta por vísceras, cabeças e pés. A FVF não deve conter penas, exceto aquelas que podem ocorrer não intencionalmente e nem resíduos de incubatórios, como cascas de ovo. Os subprodutos do abate de aves são triturados e processados para cocção em digestores contínuos atmosféricos a 200°C por 90 min, em seguida a massa é prensada para a extração do óleo e por fim o produto resultante é moído, obtendo-se a FVF (Ferroli, 2000; ABINPET, 2017), como ilustrado na Figura 3.

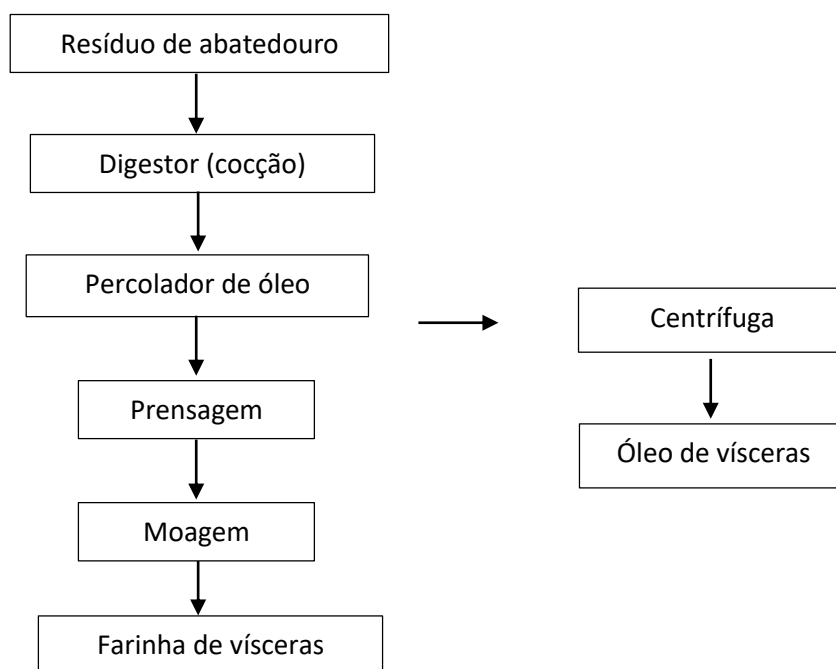


Figura 3. Fluxograma do processo de obtenção de farinha de vísceras de aves. Adaptado de ABINPET (2017).

2.4. Comportamento dos ingredientes proteicos de origem vegetal durante o processo de extrusão

O cozimento por extrusão é definido como o processo no qual os materiais homogêneos, expansíveis, amiláceos e/ou proteicos são plastizados em um tubo por uma combinação de umidade, pressão, calor e cisalhamento mecânico (Riaz, 2000). Isso resulta em gelatinização de componentes de amido, desnaturação de proteínas, alongamento ou reestruturação de componentes e expansão do produto (Smith, 1975). O processamento por extrusão é amplamente utilizado na produção de alimentos para seres humanos como massas, *snacks*, cereais matinais e análogos de carne (Faller et al., 1999; Riaz, 2005). Também é o principal processamento usado na produção de alimentos secos para animais de estimação, pois além da homogeneização dos nutrientes, esse processo garante a eliminação de microrganismos patogênicos (Cheftel, 1989), inativação de alguns fatores antinutricionais (Fellows, 2009) e melhora a digestibilidade dos nutrientes (Singht et al., 2007).

A indústria *pet food* passou a incluir proteínas de origem vegetal em suas formulações devido à sua adequada qualidade, preço competitivo e as características funcionais desses ingredientes dentro do processo de produção, uma vez que um fator limitante para a inclusão de altos teores de proteína nas dietas é a dificuldade de se processar proteína de origem animal desidratadas em extrusoras de rosca simples. Pois a inclusão elevada de proteínas de origem animal desidratadas nesse tipo de extrusora interfere na geração de viscosidade e transição de fases no canhão extrusor (GUY, 2001), quando a inadequada formação de massa visco-amorfa não permitindo a adequada expansão e formação de estrutura celular, gerando kibbles densos, duros e quebradiços. Dessa forma, o aspecto relevante quanto à inclusão das proteínas de origem vegetal no processo de extrusão de alimentos são suas propriedades funcionais que, por definição, são propriedades físico-químicas que determinam como uma proteína se comportará em um sistema de produção de alimentos (Kinsella, 19769; Hermansson, 1979).

As propriedades funcionais das proteínas podem ser classificadas, de acordo com Kinsella (1979) e Moure et al. (2006) em três grupos principais: 1) propriedades relacionadas com hidratação (capacidade de absorção e retenção de água, solubilidade, espessamento); 2) propriedades relacionadas com a estrutura proteica

e características reológicas (viscosidade, geleificação, elasticidade, adesividade); 3) propriedades relacionadas com a superfície da proteína (atividades emulsionantes e espumantes, formação de filmes proteicos-lipídicos). Essas propriedades variam com pH, temperatura, concentração de proteína, fração da proteína, tratamento prévio (térmicos, físicos, químicos e enzimáticos) e possíveis interações com outras macromoléculas do meio. Embora as propriedades funcionais possam ser classificadas de forma individual, na prática elas estão sempre correlacionadas. A partir do conhecimento das propriedades funcionais das proteínas e do processo de extrusão, acredita-se que as propriedades de maior influência na produção de *pet food* seriam a solubilidade, capacidade de retenção de água, formação de gel e viscosidade.

A solubilidade é caracterizada como a dissolução do nitrogênio (N) em meio aquoso, pode ser medida através do índice de dispersibilidade proteica (IDP). A solubilidade de uma proteína é afetada por muitos fatores, incluindo pH do meio e a exposição ao calor. A solubilidade do N da soja geralmente é alta nas faixas de pH entre 1,5 a 2,5 e em pH acima de 6,5 (Kinsella, 1979). Essa é comumente apontada como a propriedade funcional mais importante na produção de alimentos para seres humanos, pois afeta outras funcionalidades proteicas (Bian et al., 2003, Kinsella, 1979). A solubilidade do N ocorre até uma determinada faixa de temperatura, específica para cada tipo de proteína, acima disso ocorre a desnaturação das proteínas com redução de sua solubilidade. Em condições de baixa inclusão de água (24,5%), como no caso do processo de extrusão, temperaturas de até 100°C não levaram a desnaturação das frações de globulinas 7S e 11S (principais proteínas da soja), enquanto em temperatura de 150°C foi constatada a desnaturação da fração globulina 7S da soja (Kitabatake et al., 1990).

Além da adição de energia térmica e da água, a desnaturação das proteínas é favorecida pela aplicação de energia mecânica específica (EME) durante o processo de extrusão. Nesse processo as macromoléculas dos ingredientes proteicos perdem sua estrutura nativa (secundária ou terciária) e se desdobram adquirindo uma estrutura primária alinhada em direção ao fluxo (Riaz, 2005). Esse desdobramento é muito importante na alimentação de cães e gatos, pois facilita a digestão da proteína aumentando seu aproveitamento pelo animal (Singht, 2007). É também graças a desnaturação das proteínas (alinhamento em direção ao fluxo) que

são produzidos alguns tipos de análogos de carne a partir de ingredientes da soja. A desnaturação das proteínas interfere em outras propriedades funcionais, ela resulta em maior capacidade de retenção de água (CRA) (Gonzalez et al., 2001) que por sua vez leva a maior viscosidade da massa (Kinsella, 1979; Añón et al., 2001). No entanto, é importante destacar que a desnaturação excessiva, geralmente induzida pela aplicação elevada de EME, pode levar a diminuição da CRA e da viscosidade.

A CRA é definida como a capacidade de uma matriz de proteína manter a água contra a gravidade (Kinsella, 1979). Com o aquecimento, o desdobramento da proteína desnaturada expõe mais locais de ligação à água, resultando em maior CRA e, conseqüentemente, após o resfriamento, conduzirá à formação de gel (Damodaran, 1988). A CRA não é apenas afetada pelo estado da desnaturação de proteínas, mas também pelo tipo de agregação das proteínas. As frações glicinina e β -conglícina da proteína da soja apresentam diferentes propriedades de agregação (Sorgentini et al., 1991), quanto maior a relação de β -conglícina:glicinina menor será a CRA (YAO et al., 1988). A CRA também está diretamente relacionada com a concentração da proteína e o IDP (Sousa et al., 1996). A CRA da farinha de soja é de 1,3 g/g, do CPS é de 1,9 a 2,2g/g e do IPS de 4,1 a 4,6 g/g (LIN et al., 1974).

A geleificação é um fenômeno importante durante o processo de extrusão, pois ele representa formação de agente ligante que possibilita a homogeneização e viscosidade da massa. O gel é formado por polímeros que formam uma rede capaz de aprisionar a água ou outras substâncias como gordura, saborizantes e aditivos alimentares (Kinsella, 1979; Hettiarachchy e Kalapathy, 1994). Devido ao baixo custo, a geleificação geralmente é obtida através da presença do amido do milho nas formulações de alimentos para cães e gatos (Rockey et al., 2010). Porém, devido a sua conformação estrutural, as proteínas são agentes gelificantes mais eficientes que os carboidratos (Oakenfull, et al., 1997; Riaz, 2005; Moure et al., 2006). A geleificação obtida a partir de proteínas, sobretudo as da soja, ocorre em três etapas: o aquecimento da solução proteica para promover o desdobramento inicial das moléculas individuais de proteína (desnaturação), agregação de moléculas de água e de moléculas proteicas de menor tamanho (formação de uma rede viscoelástica; Xiong, 2004) e, após o resfriamento, a formação de matriz

complexa composta por polipeptídios, água e outros componentes (Damodaran, 1988).

A viscosidade é a resistência de uma proteína em solução ao fluxo linear (Deak, 2004), como ocorre no canhão extrusor. Essa é uma propriedade importante quando essas proteínas são incorporadas em alimentos como sopas, massas e carnes. Diversos fatores podem alterar a viscosidade de uma proteína. A viscosidade aumenta exponencialmente com a concentração de proteínas, provavelmente devido ao aumento das interações de proteínas hidratada e a absorção de água (Kinsella, 1979; Sousa et al., 1996). A desnaturação parcial da proteína aumenta sua viscosidade devido à maior superfície de contato produzida pelo seu desdobramento (Schwenke et al., 1990; Bian et al., 2003).

De forma geral, o processo de extrusão, aliando alta pressão, temperatura e cisalhamento em fluxo laminar, com indução do desdobramento e exposição de sítios hidrofóbicos, favorece as propriedades funcionais das proteínas (Molina et al., 2002). Da mesma forma, a presença dessas propriedades funcionais favorece o processo de extrusão. A elevação da viscosidade (maior CRA e maior geleificação) causa aumento da fricção da massa dentro do canhão extrusor, elevando o cisalhamento e a transferência de EME (Miller, 1990; Sousa et al., 1996), o que por sua vez, irá resultar na formação de *kibbles* mais expandidos e melhor formatados. Este melhor processamento, por sua vez, poderá contribuir para a desnaturação das proteínas, melhorando a digestibilidade da proteína do alimento produzido (Singht, 2007; Oliveira, 2016).

2.5. Uso de proteínas de origem vegetal na alimentação de cães

Em relação aos ingredientes proteicos de origem vegetal, a soja é o mais amplamente utilizado mundialmente para a produção de alimentos para diversas espécies (Butolo, 2002). Dentre as vantagens de sua inclusão em alimentos para cães pode-se citar seu baixo custo, que permite sua inclusão em formulações mais econômicas, ser um ingrediente disponível e de qualidade consistente, ser palatável, ter bom perfil de aminoácidos, melhorar a textura da dieta, poder ser utilizada como fonte proteica principal e ser uma boa fonte de fibra (Fahey, 2007).

A proteína da soja pode apresentar boa digestibilidade para cães, a depender de seu processamento, podendo ser comparada neste quesito às proteínas de

origem animal (Zuo et al., 1996; Bednar et al., 2000; Clapper et al., 2001; Sá-Fortes, 2005; Carciofi et al., 2006; Torola et al., 2013). Os processos utilizados para inativar ou reduzir os fatores anti-nutricionais da soja diferem quanto as variáveis aplicadas como tempo, temperatura, pressão, umidade, superfície exposta e tamanho da partícula (Butolo, 2010; Mateos et al., 2005). Os sistemas mais conhecidos para tratar a soja são: cozimento; tostagem por tambor rotativo, vapor úmido, vapor seco e jet-sploder; micronização e extrusão (Mateos et al., 2005).

Os estudos encontrados na literatura que utilizaram derivados de soja na alimentação de cães são, majoritariamente, relacionados a inclusão do farelo de soja na dieta desses animais, *in natura* ou avaliando essa matéria prima após o processamento mecânico ou enzimático (Brow, 2009; Tortola, 2013; Felix et al., 2012). Em cães e gatos, a inclusão do farelo de soja nas formulações serve como fonte de proteínas, geralmente com o objetivo de baratear o custo da fórmula. Recomenda-se a inclusão de até 15% para não afetar a digestibilidade da dieta (Yamka et al., 2003; Félix et al., 2012) ou ainda dietas contendo até 22,4 g de estaquiose/kg e até 2 g de rafinose/kg não afetam a digestibilidade dos nutrientes ou o aumento de flatulências (Yamka et al., 2006). Em contrapartida, Félix et al. (2013) encontraram maior incidência de flatulências em cães alimentados com farelo de soja em comparação ao CPS e IPS. Ainda, estudos que apontam a diminuição da digestibilidade dos nutrientes em cães atribuem esse resultado à elevada porção fibrosa dessa matéria prima e não à presença dos oligossacarídeos (Zuo et al., 1996; Clapper et al., 2001; Yamka et al., 2006).

Recentemente, alguns estudos encontraram resultados benéficos ao animal quando o farelo de soja é incluído, indicando que essa matéria-prima também pode ser usada como fonte de fibras. Os monoligossacarídeos (rafinose e estaquiose) naturalmente presentes nessa matéria prima contribuem com a saúde intestinal de cães, pois induzem a formação de ácidos graxos de cadeia curta (Tortola et al., 2013; Maria et al., 2017) e aumento da secreção de imunoglobulina A, que atua no sistema imunológico (Maria et al., 2017).

Poucos estudos foram encontrados usando os co-produtos CPS e IPS da soja porém, quando estudados, mostraram-se sempre superiores. No estudo de Wiernusz et al. (1995) em cães, os autores observaram que o processamento de soja com obtenção de CPS e IPS levou ao aumento da digestibilidade da proteína

buta (89,8 e 89,7%, respectivamente) em relação aos grãos de soja e ao farelo de soja (86,7 e 87,0%, respectivamente). Félix et al. (2013) avaliaram o uso de farelo de soja, CPS e IPS em dietas para cães e encontraram valores de digestibilidade da matéria orgânica de 84,7, 78,4 e 92,5, respectivamente e o coeficiente de digestibilidade da proteína bruta de 89,8, 83,9 e 98,8, respectivamente. Os autores atribuíram a menor digestibilidade encontrada na dieta usando CPS ao baixo índice de dispersibilidade da proteína encontrada nessa matéria prima de 11,01%, enquanto que o farelo de soja foi de 24,01% e o IPS de 43,52%.

Da mesma forma, poucos estudos foram encontrados em relação à inclusão do glúten de milho 60% em dietas para cães. Carciofi et al. (2006) verificaram maiores coeficientes de digestibilidade da proteína bruta para as dietas à base de glúten de milho em relação às dietas formuladas com farelo de soja e farinha de vísceras de frango (88,13%, 86,31%, e 84,84%, respectivamente). Igualmente, Yamka et al. (2004) avaliaram a inclusão em níveis crescentes de farelo de glúten de milho 60% em alimentos para cães e verificaram que este ingrediente é de alta digestibilidade para a espécie.

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A partir das informações levantadas foi possível verificar escassez de dados em relação ao comportamento das proteínas de origem vegetal durante o processo de extrusão. Verifica-se, adicionalmente, que estudos sobre CPS, IPS e GM quanto à digestibilidade e formação de fezes em cães são muito restritos, justificando comparações entre estas proteínas de origem vegetal e a FVF. Dessa forma, a presente dissertação teve como objetivo avaliar os efeitos da substituição da fonte proteica FVF pelas fontes de proteína de origem vegetal CPS, ISP e GM sobre as características de extrusão, macroestrutura dos *kibbles* e digestibilidade aparente dos nutrientes de alimentos para cães.

4. REFERENCIAS

ABINPET. (2017) Manual Pet Food do Brasil. 9 ed. p.162-163.

Añón MC, Sorgentini DA, Wagner JR (2001) Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 49:4852-4858.

Bednar GE, Murray SM, Patil AR, Flickinger EA, Merchen NR, Fahey JR GC (2000) Selected animal and plant protein sources affect nutrient digestibility and fecal characteristics of ileally cannulated dogs. **Archives of Animal Nutrition** 53:127-140.

Bian Y, Myers DJ, Dias K, Lihono MA, Wu S, Murphy PA (2003) Functional properties of soy protein fractions produced using a pilot plant-scale process. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 80:545-549.

Brown WY (2009) Nutritional and ethical issues regarding vegetarianism in the domestic dog. **Recent Advances in Animal Nutrition** 17:137-143.

Carciofi AC, Pontieri R, Ferreira CF, Prada F (2006) Avaliação de dietas com diferentes fontes protéicas para cães adultos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 35:754-760.

Carciofi AC, Takakura FS, De-Oliveira LD, Teshima E, Jeremias JT, Brunetto MA, Prada F (2008) Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 92:326-336.

Carvalho NM, Nakagawa J (2000) **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.

Cheftel JC (1989) Extrusion cooking and food safety, In: Mercier, C., Linko, P, Harper, JM (Eds) **Extrusion Cooking**. St. Paul : American Association of Cereal Chemists p. 435-461.

Damodaran S (1988) Refolding of thermally unfolded soy proteins during the cooling regime of the gelation process: effect on gelation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 36:262-269.

Faller JY, Klein BP, Faller JF (1999) Acceptability of extruded corn snacks as affected by inclusion of soy protein. **Journal of Food Science** 64:185-188.

Felix AP, Carvalho MP, Alarca LG, Brito CBM, Oliveira SG, Maiorka A (2012) Effects of the inclusion of carbohydrases and different soybean meals in the diet on palatability, digestibility and faecal characteristics in dogs. **Animal Feed Science and Technology** 174:182-189.

Felix AP, Rivera NLM, Sabchuk TT, Lima DC, Oliveira SG, Maiorka A (2013) The effect of soy oligosaccharide extraction on diet digestibility, faecal characteristics, and intestinal gas production in dogs. **Animal Feed Science and Technology** 184:86-93.

Fellows PJ (2009) **Food Processing Technology: Principles and Practice**. 3 ed. Elsevier, 928p.

Ferroli PCM, Fiod Neto M, Casarotto Filho N, Castro JEE (2000) Fábricas de subprodutos de origem animal: a importância do balanceamento das cargas dos digestores de vísceras. **Production** 10:05-20.

Funaba M, Oka Y, Kobayashi S, Kaneko M, Yamamoto H, Namikawa K, Iriki T, Hatano Y, Abe M (2005) Evaluation of meat meal, chicken meal, and corn gluten meal as dietary sources of protein in dry cat food. **Canadian Journal of Veterinary Research** 69:299.

Geraldi CAQ, Pereira NC, Frare LM, Klassen T (2012) Análise econômico-financeira de um novo processo de produção de derivados de milho. **Engevista** 14:185-195.

Guy R (2001) Extrusion cooking: technologies and applications. In: RIAZ M. N. **Selecting the right extruder**. Woodhead publishing. p.29-50.

Hermansson AM (1979) Methods of studying functional characteristics of vegetable proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 56:272-279.

Hettiarachchy NS, Ziegler GR (1994) **Protein functionality in food systems**. CRC Press.

Hill DA, Pas D (2004). Alternative proteins in companion animal nutrition. In Pet Food Association of Canada Fall Conf., Toronto, Ontario.

Hymowitz T, Collins FI, Panczner J, Walker WM (1972) Relationship Between the Content of Oil, Protein, and Sugar in Soybean Seed 1. **Agronomy Journal** 64:613-616.

Johnson ML, Parsons CM, Fahey GC, Merchen NR, Aldrich CG (1998) Effects of species raw material source, ash content, and processing temperature on amino acid digestibility of animal by-product meals by cecectomized roosters and ileally cannulated dogs. **Journal of Animal Science** 76:1112-1122.

Johnston SP, Nickerson MT, Low NH (2015) The physicochemical properties of legume protein isolates and their ability to stabilize oil-in-water emulsions with and without genipin. **Journal of Food Science and Technology** 52:4135-4145.

Kawauchi IM (2012) **Valor nutricional e parâmetros de qualidade de subprodutos de origem animal para cães**. Tese (Doutorado em Medicina Zootecnia) - Unesp, Jaboticabal.

Kent NL, EVERS AD (1994) **Technology of cereals**: An introduction for students of food science and agricultural. St Paul: AACC. p. 234-236.

Kinsella JE (1979) Functional properties of soy proteins. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 56:242-258.

Lin MJY, Humbert ES, Sosulski FW (1974) Certain functional properties of sunflower meal products. **Journal of Food Science** 39:368-370.

Maria APJ, Ayane L, Putarov TC, Loureiro BA, Neto BP, Casagrande, MF, Gomes MOS, Glória MBA, Carciofi, AC (2017) The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. **Journal of Animal Science** 95:2452-2466.

Miller RC, Mulvaney S (1990) Unit operations and equipment IV. Extrusion and extruders. **Breakfast cereals and how they are made** p. 135-193.

Molina E, Papadopoulou A, Defaye A, Ledward, DA (2002) Functional properties of soy proteins as influenced by high pressure: Emulsifying. In **Progress in Biotechnology**, p. 557–562.

Moure A, Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC (2006) Functionality of oilseed protein products: a review. **Food Research International** 39:945-963.

Oakenfull D, Pearce JOHN, Burley RW (1997) Protein gelation. **Food Science and Technology-New York-Marcel Dekker** p. 111-142.

Oliveira MCC (2016) **Selênio e mucosa intestinal e cozimento do amido, digestibilidade dos nutrientes e produtos de fermentação nas fezes de cães**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Rausch KD, Belyea, RL (2006) The future of coproducts from corn processing. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 128:47-86.

Riaz MN (2000) **Extruders in food applications**. CRC press.

Riaz MN (2005) Soy applications in foods. In: STRAHM B. **Meat Alternatives**. Florida: Taylor & Francis. p. 135-154.

Rokey GJ, Plattner B, Souza, EM (2010) Feed extrusion process description. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39:510-518.

Silva MS, Naves MMV, Oliveira RBD, Leite ODS (2006) Composição química e valor protéico do resíduo de soja em relação ao grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 26:571-576.

Singh, S, Gamlath S, Wakeling L (2007) Nutritional aspects of food extrusion: a review. **International Journal of Food Science & Technology** 42:916-929.

Smith OB (1975) Textured Vegetable Proteins, paper presented at the World Soybean Research Conference, University of Illinois, August, p.3–8.

Sorgentini DA, Wagner JR, Arrese EL, Anon MC (1991) Water imbibing capacity of soy protein isolates: influence of protein denaturation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 39:1386-1391.

Sousa IMN, Morgan PJ, Mitchell JR, Harding SE, Hill SE (1996) Hydrodynamic characterization of lupin proteins: Solubility, intrinsic viscosity, and molar mass. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 44:3018-3021.

Valadares Filho SC, Paulino PVR, Magalhães KA (2006) **Exigências nutricionais de zebuínos e tabelas de composição de alimentos BR-CORTE**. Viçosa: UFV Suprema Gráfica Ltda,142p.

Wang H, Johnson LA, Wang T (2004) Preparation of soy protein concentrate and isolate from extruded-expelled soybean meals. **Journal of the American Oil Chemists' Society** 81:713-717.

Wiernusz CJ, Shields RG, Van Vlierbergen DJ, Kigin PD, Ballard R (1998) Canine nutrient digestibility and stool quality evaluation of canned diets containing various soy protein supplements. **Veterinary Clinical Nutrition** 2:49-56.

Yamka RM, Kitts SE, True AD, Harmon DL (2004) Evaluation of maize gluten meal as a protein source in canine foods. **Animal Feed Science and Technology** 116:239-248

Yamka RM, Kitts SE, Harmon, DL (2005) Evaluation of low-oligosaccharide and low-oligosaccharide low-phytate whole soya beans in canine foods. **Animal Feed Science and Technology** 120:79-91.

Yao JJ, Wei LS, Steinberg MP (1988) Water-Imbibing Capacity and Rheological Properties of Isolated Soy Proteins. **Journal of Food Science** 53:464-467.

Zuo Y, Fahey JR. GC, Merchen NR, Bajjalieh NL (1996) Digestion responses to low oligosaccharide soybean meal by ileally-cannulated dogs. **Journal of Animal Science** 74:2441-2449.

CAPÍTULO 2 - Vegetable protein sources on extrusion parameters and digestibility of dog diets

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas da **Journal of Animal Science**.

Running head: protein sources on extruded diets for dogs

Vegetable protein sources on extrusion parameters and digestibility of dog diets ^{1,2}

F. M. Peres, M. A. Baller, P. D. G. Pacheco, T. C. Putarov, A. C. Carciofi ³

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil

¹Presented partially as an oral communication at the 21st European Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN) Congress, Cirencester, United Kingdom, September, 20th to 23rd, 2017.

²Acknowledgments: The experiment was supported by the Archer Daniels Midland Company (ADM). The scholarship of the first author was supported by CNPq (process number 132888/2016-5). None of the authors has any conflicts of interest. The authors acknowledge the financial and technical support of Affinity Pet Care, Campinas, SP, Brazil to the Laboratory of Research in Nutrition and Nutritional Diseases of Dogs and Cats “Prof. Dr. Flávio Prada” and Manzoni Industrial Ltda, Campinas, SP, Brazil for the extrusion equipment.

³ Corresponding author: aulus.carciofi@gmail.com

ABSTRACT: The present study evaluated the substitution of poultry by-product meal (**PBM**) by different inclusions of soy protein concentrate (**SPC**), soy protein isolate (**SPI**) and corn gluten meal 60 (**GM**) on the extrusion characteristics, kibble macrostructure and apparent digestibility of dog foods. Two studies were conducted, the first evaluated the raw materials effects on extrusion process and kibble formation and the second experiment used dogs to evaluate the digestibility of diets containing the protein sources under study. The first study followed a completely randomized design with 10 treatments (diets), a control diet with only PBM as the protein source was formulated and 9 test diets formulated by the replacement of 20%, 40% or 60% of the dietary protein by SPC, SPI, or GM. The second study followed a completely randomized design with four diets and six animals per diet, totaling 24 dogs. The diets selected for the second study were: the PBM diet and the diets with the greater substitution of dietary protein by vegetable protein sources: SPC60%; SPI60%; GM60%. For the first study, when differences were detected by the F test, the effects of the inclusion levels of each protein ingredient were compared by polynomial contrasts. For the second study, when significant differences were detected with ANOVA F tests, multiple comparisons of the means were performed using the Tukey test. Based on the observed results, due to the functional properties of the soybean proteins, an increasing inclusion of SPC promoted a linear increase in viscosity development and specific mechanical energy transfer (**SME**), which increased from 17.1 kW-h/ton for PBM to 24.9 kW-h/ton with 60% of replacement of the dietary protein by SPC ($P < 0.001$), and was 30% higher when compared to SPI and 40% higher when compared to GM ($P < 0.001$). The SPI transferred SME to the mass in a quadratic form ($P < 0.001$), contributing to the extrusion process above of 40% replacement of the diet protein by SPI, probably due to its intense industrial treatment which may have reduced its functional properties. The inclusion of GM did not favor the extrusion process. SPC and SPI showed high protein digestibility for dogs, similar to PBM diet ($P < 0.001$), with values of

90.6%, 90.9% and 89.0%, respectively. The protein digestibility of GM treatment was superior to PBM (91.8%; $P < 0.001$). The results found for faeces characteristics indicate that SPC still contains fermentable carbohydrates which, when compared to other treatments, lower fecal pH by 8% and increased fecal moisture by 20% ($P < 0.001$). In conclusion, the treatments containing SPC and SPI promoted an increased application of SME, starch gelatinization and kibble expansion. The vegetable protein sources SPC, SPI and GM had high digestibility of crude protein.

Key words: corn gluten meal, functional properties, poultry by-product meal, soy protein isolate, soy protein concentrate

INTRODUCTION

Extrusion is the major thermal process used in 95% of all pet food, it results in the gelatinization of starch, denaturation of proteins, stretching and texturing of components (Camire and King, 1991; Riaz, 2005), inactivates some antinutritional factors (Fellows, 2009) and improves the digestibility (Singht et al., 2007). The pet food industry started to include proteins derived from vegetables due to their high quality and functional ingredients, also because one limiting factor for the inclusion of high levels of protein in the diets is the difficulty to process animal protein.

Corn gluten meal (**GM**) is an interesting source as they contain at least 60% of protein, excellent digestibility in dogs (Yamka et al., 2004; Carciofi et al, 2006), good amino acid profile (Rausch and Belyea, 2006) and also used to decreases the urinary pH (Funaba et al., 2005). Similarly, the soy protein concentrate (**SPC**) and soy protein isolate (**SPI**) with 60% and 85% CP, respectively, have the potential for inclusion in pet food diets. Besides the good amino acid profile (Jacob et al, 1996), these ingredients also have structural functions during the extrusion process (Riaz, 2005).

The functional properties of soybeans water absorption, solubility, viscosity, gel formation, elasticity, aggregation, emulsifying and foaming activities (Kinsella, 1979; Moure et al., 2006; Jideani, 2011) are extensively exploited in extruded products used in food production as meat analogues, soy-based snacks, food bars and cereals (Faller et al., 1999; Riaz, 2005). Our hypotheses were that (i) the functional behavior of soy proteins observed on human food will be equally beneficial in the production of dog foods (ii) the digestibility will be similar between the control diet and the vegetable proteins, as they are purified proteins. The aim of this study was to evaluate the effects of the substitution of the protein by-product meal (**PBM**) by SPC, SPI and GM on the extrusion process, digestibility and fecal and urine characteristics of dogs.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted at the Laboratory of Research on Nutrition and Nutritional Diseases of Dogs and Cats "Prof. Dr. Flávio Prada", College of Agrarian and Veterinarian Sciences, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Sao Paulo, Brazil. All experimental procedures were approved by the Ethics and Animal Welfare Committee (Protocol number: 6.184/16).

Three vegetable protein sources were studied: 1) Soy Protein Concentrate (SPC; Arcon, Archer Daniels Midland Company, Illinois, USA); 2) Soy Protein Isolate (SPI; Pro-Fam; Archer Daniels Midland Company, Illinois, USA) and 3) Corn gluten meal (GM; Salus Comercio de Produtos de Saude e Nutricao Animal Ltda., Santo Antonio de Posse, Brazil). These ingredients were compared to a control diet containing only poultry by-product meal (PBM; Agromix Industria e Comercio de Alimentos Ltda, Jaboticabal, Brazil) as protein source. Two studies were conducted, the first to evaluate the effects of these raw materials on pet food extrusion process and kibble formatation. The second used dogs to evaluate the digestibility and feces characteristics of diets with these protein sources.

Diets and study design of the extrusion experiment

The ingredients were purchased, stored, sampled and analyzed for dry matter, ash content and crude protein (Table 1). A control diet with only PBM as the protein source was formulated to achieve 25% of CP, and the 9 test diets were formulated to obtain the following the replacement of 20%, 40%, and 60% of the dietary protein with SPC, SPI, or GM. However, the final composition of the PBM diet was 28.5% CP, therefore the actual replacements were 18%, 35% and 53%. All diets were balanced to have similar chemical compositions, following the nutrient recommendations of AAFCO (2010) for dog maintenance. The amino acid profile of the protein sources used in the study were analyzed

and the results are presented on Table 1. The ingredient composition of diets are presented on Table 2.

The ingredients were mixed and ground in a hammer mill (Sistema Tigre de Mistura e Moagem, Moinhos Tigre Ltda, São Paulo, Brazil), using a screen sieve size of 0.9 mm. The diets were extruded in a single-screw extruder (Mex- 250, Manzoni Industria Ltda, Campinas, Brazil) with a processing capacity of 250 kg/h. The independent variables extruded screw speed (606.5 ± 10.5 RPM), water injection (10.2 ± 0.4 %), estimated steam injection (5.9 ± 0.1 %), cutting knife speed (1238.4 ± 49.8 RPM), die open area (150.9 ± 5.6 mm²/ton/h) and productivity (255.8 ± 9.4 kg/h) were previously established. In order to study the influence of the protein sources on extrusion processing, these parameters were not changed and remained constant for all diets.

After stabilization of the extruder (about 30 minutes), the following parameters were recorded every 10 minutes during processing: preconditioner temperature, engine amperage, dough temperature before die, dough temperature out extruder, dough pressure before die, extruder output mass, water infusion, bulk density after extruder and bulk density after dryer. After extrusion, the kibbles were dried in a forced air dryer at 105 °C for approximately 20 minutes. At each observation time (10 minutes), samples of food were collected at the following points: after preconditioner, after extruder and after dryer.

The specific mechanical energy (SME; kW-h/ton) was calculated for each treatment in accordance with Riaz (2007), with the following formula:

$$SME = \frac{(\sqrt{3} \times \text{Voltage} \times (\text{WA} - \text{EA}) \times (\cos\text{Fi} \div 1000)) \times 1000}{\text{Throughput}}$$

where: Voltage = (220 V); WA = working amperage of the motor during processing (A);

EA = motor no load amperage; cosFi = power factor (0.76); Throughput = raw material feed rate into the preconditioner (ton/hr)

Extrudate chemical composition and macrostructure

Food samples out the drier, before the coating system and without fat and palatant additions were grounded in a cutting mill (Mod MA-350, Marconi, Piracicaba, Brazil) fitted with a 1 mm screen sieve size. Samples were analyzed according to the Association of American Feed Control Officials (AOAC, 1995) for DM by oven-drying the sample (934.01), converting to ash with muffle furnace incineration (942.05), measuring the CP content with the Kjeldahl method (954.01) and measuring the acid-hydrolyzed fat content (954.02). Diets were also evaluated for degree of starch gelatinization using the amyloglucosidase method (Hoseney, 1994) with modifications proposed by Sá et al. (2013) including the use of amyloglucosidase from *Aspergillus niger* (code A9913, Sigma-Aldrich Brazil, São Paulo, Brazil) and quantification of glucose on the supernatant by a glucose oxidase test (GOD-ANA, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brazil) using a semi-automated glucose analyser (Labquest model BIO-2000, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brazil) and for in vitro digestibility of the OM according to Hervera et al. (2007).

To study kibble macrostructure, the length (**le**), diameter (**de**), and mass (**me**) of 20 extrudates of each treatment were measured and used to obtain the radial expansion ratio (**RE**), specific length (**l_{sp}**), and piece density (**ρ**), as described below:

$$RE = \frac{de^2}{d_d^2} \quad l_{sp} = \frac{le}{me} \quad (mm/g) \quad \rho = \frac{4 me}{\pi \times de^2 \times le} \quad (g/cm^3)$$

where: d_d = die diameter.

Additionally, 40 samples of each treatment were submitted to a cutting force test in a texturometer (TA-XT Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems, Surrey, UK) equipped with a guillotine style probe.

Animals, study design, digestibility and fecal characteristics of dogs

Four diets were selected for in vivo evaluation: the PBM as a control diet based on protein source of animal origin; **SPC60** soy protein concentrate replaced 60% of the diet protein; **SPI60** soy protein isolate concentrate replaced 60% of the diet protein; **GM60** corn

gluten meal replaced 60% of the diet protein. Twenty four adult Beagle dogs, male and female, with mean body weight of 9.1 ± 1.7 kg and mean age of 4.3 ± 3.5 years old were used. The health of the animals was assessed prior to the beginning of the study. All dogs belonged to the Laboratory of Research on Nutrition and Nutritional Diseases of Dogs and Cats "Prof. Dr. Flávio Prada".

The experiment followed a completely randomized design with four diets and six dogs per diet. The experiment lasted 13 days, as follows: days 1 to 5 for diet adaptation; days 6 to 10 for total collection of feces for the digestibility trial; days 11 to 13 for total collection of urine and fresh feces (maximum 10 minutes after elimination) to determine fecal pH. During the adaptation period, dogs were housed in kennels (1.5 m x 3.5 m), with daily access to an outside playground for exercise and socialization. During the collection of feces and urine, the dogs were housed in individual stainless steel metabolic cages (1 m x 1 m x 1 m) equipped with a system to separate feces and urine for collection. Dogs were fed individually calculated amounts of food, according to the energy value of the diet, estimated based on their chemical composition and the individual energy requirement of each animal, according to the recommendations of the National Research Council (2006). The daily amount of food was divided into two equal meals, provided at 09h and 16h. Water was offered *ad libitum*.

The coefficient of total tract apparent digestibility was determined by the method of total collection of feces without urine collection, following the recommendations of the Association of American Feed Control Officials (2010). Food intake was recorded daily, by weighing offered and refused food amounts at each meal time. Feces were quantitatively collected twice a day (08h and 17h), weighed, packed in individual plastic bags and stored in a freezer (-15 °C) for later analysis. Fecal samples were subjectively scored according to the following system: 0 = watery with liquid that can be poured; 1 = soft and unformed; 2 = soft and malformed, with stool assuming shape of container; 3 = soft, formed, and moist with

softer stool that retained its shape; 4 = well-formed and consistent stool that did not adhere to the floor; and 5 = hard and dry pellets with small and hard mass (Carciofi et al., 2008). Stools with values between 3 and 4 were considered adequate.

At the end of the collection period, the fecal samples were thawed, homogenized, and pooled for each dog. Before laboratory analysis, the fecal samples were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h (320-SE, FANEM, Sao Paulo, Brazil). Diets and fecal samples were ground in a cutting in a knife type mill (MOD 340, ART LAB, São Paulo, Brazil) fitted with a 1-mm screen sieve, and analyzed according to the Association of American Feed Control Officials (AOAC, 1995) for dry matter by oven-drying the sample (934.01), converting to ash with muffle furnace incineration (942.05), measuring the crude protein content with the Kjeldahl method (954.01), and measuring the acid-hydrolyzed fat content (954.02). Total starch was measured according to Karkalas (1985) and Holm et al. (1986). The gross energy contents of diets and fecal matter were determined using a bomb calorimeter (IKA calorimeter, C200; IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany).

To measure fecal pH, 2 g of fresh feces was diluted in 6 mL of ultrapure water and the pH measured with a pH meter (DM20, Digicrom Analítica Ltda, São Paulo, Brazil) with 0.01 pH accuracy. To determine the urine pH, density and volume, urine was quantitatively collected in plastic bottles with 100 mg of thymol (Tymol LabSinth, Diadema, São Paulo, Brazil) as a preservative. The samples were collected twice a day, and the urine of each animal was filtered and stored in plastic bottles under refrigeration (4°C). Each 24h urine composite sample was measured to determine volume, pH and density using a refractometer (Atago CO-T2 NE, Japan).

Statistical analysis

The extrusion study was analyzed as a completely randomized design. The experimental unit was the sampling time at each 10 minutes interval during extrusion, with

four replicates for each time-point per treatment. When differences were detected by the F test, the effects of the inclusion levels of each protein ingredient were compared by polynomial contrasts. Four levels of inclusions were considered in the statistical analysis: zero (control), 20%, 40% and 60% substitution of vegetable protein (SPC, SPI, GM). Comparisons between the evaluated ingredients were carried out by pre-established orthogonal contrasts: SPC x SPI (SPC 20% + 40% + 60% versus SPI 20% + 40% + 60%); SPC x GM (SPC 20% + 40% + 60% versus GM 20% + 40% + 60%); SPI x GM (SPI 20% + 40% + 60% versus GM 20% + 40% + 60%).

The digestibility study was analyzed in a completely randomized design. The experimental unit was dog, with six repetitions per diet. When significant differences for nutrient intake, urine and fecal characteristic or total tract apparent nutrient digestibility were detected with ANOVA F test, multiple comparisons of the means were performed using the Tukey test. For both experiments, data were analyzed using the MIXED procedure of the SAS software (version 9.3, SAS Institute, Cary, NC, USA). All data complied with the assumptions of the ANOVA models. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

On the extrusion experiment, the chemical analysis of the extruded diets after drying, but before coating with poultry fat and palatant demonstrate similar values of crude protein and dry matter (Table 3). The fat content, however, reduced proportionately with the inclusion of soy sources, as these ingredients have less fat than the PBM. The inclusion of SPC (Table 4) resulted in a quadratic increase on preconditioner temperature and the temperature of the mass under extrusion ($P < 0.05$). A linear increase in motor amperage and SME application were observed which increased from 17.1 kW-h/ton for PBM to 24.9 kW-h/ton with 60% of replacement of the dietary protein by SPC and could be described as a function of the percent

of replacement of the dietary protein by SPC (**SPCRepl**) as presented on Figure 1 and as follows: $SME \text{ (kW-h/ton)} = 0.146 * SPCRepl + 17.075$; $r^2 = 0.95$; $P < 0.001$. The higher temperature and applied SME resulted in a quadratic reduction of bulk density (Figure 2; $Bulk \text{ density (g/L)} = 0.021 * SPCRepl^2 - 2.945 * SPCRepl + 422.41$; $r^2 = 0.95$; $P < 0.001$), which decreases from 419.3 g/L for PBM to 328.0 g/L with 60% replacement of dietary protein by SPC. The greater transference of SME changed the macrostructure of the extrudates with a reduction on piece density and increase on specific length ($P < 0.001$). There was also a linear increase on starch gelatinization degree (Figure 3) that can be described as follows: $Starch \text{ gelatinization degree (\%)} = 0.171 * SPCRepl + 80.48$; $r^2 = 0.75$; $P < 0.001$. The in vitro organic matter digestibility, however, was similar between treatments.

The inclusion of SPI, like the previous ingredient, resulted in a quadratic increase in engine amperage and SME implementation (Table 5) and could be described as a function of the percent of replacement of the dietary protein by SPI (**SPIRepl**) as presented on Figure 4 and as follows: $SME \text{ (kW-h/ton)} = 0.0046 * SPIRepl^2 - 0.172 * SPIRepl + 17.05$; $r^2 = 0.88$; $P < 0.001$. The bulk density decreased linearly and could be described as: $Bulk \text{ density (g/L)} = -0.627 * SPIRepl + 414.95$; $r^2 = 0.66$; $P < 0.001$ (Figure 5). However, in contrast to the soybean protein concentrate, there was a quadratic reduction in extrusion temperature ($P < 0.001$). The ingredient also improved kibble macrostructure, as observed by a quadratic increase on radial expansion and specific length ($P < 0.05$), and a linear reduction on the piece density ($P < 0.001$). There was also a linear increase in starch gelatinization (Figure 6; $Starch \text{ gelatinization degree (\%)} = 0.095 * SPIRepl + 78.05$; $r^2 = 0.51$; $P = 0.009$). However, no changes were observed on in vitro digestibility of OM ($P > 0.05$).

The inclusion of GM, unlike the derivatives of soybean did not induce clear changes on extrusion parameters (Table 6). There was a quadratic reduction on extrusion temperature ($P < 0.001$), but this was not consistent and only different for the GM40 diet, and also a

quadratic reduction on extrusion pressure ($P < 0.001$). In contrast to the observed effects of the soybean derivatives, no differences were observed for the SME transference. For the effects on kibble formation, the GM inclusion induced similar effects than the ones observed for the soybean derivatives, with reduced piece density and increased radial and longitudinal expansion (specific length) ($P < 0.05$). The cutting force also changed quadratically, increasing until 40% protein replacement but decreasing for GM60 diet ($P < 0.001$). The bulk density presented quadratic behavior and could be described as a function of the percent of replacement of the dietary protein by GM (**GMRepl**) as follows: Bulk density (g/L) = $-0.027 * \text{GMRepl} + 0.839 * \text{Repl} + 412.09$; $r^2 = 0.396$; $P = 0.0378$). The starch gelatinization did not change with the addition of corn gluten meal, differing from the observed responses with the soy products.

To more appropriately study the effects of the ingredients on the extrusion parameters, the responses were compared by orthogonal contrasts established with the three replacement levels (20% + 40% + 60%) of each protein source (Table 7). Comparing SPC with SPI revealed lower engine amperage, extrusion temperature and 30% lower SME transference for the diets with SPI ($P < 0.001$). Consequently, smaller specific length, and higher piece density and cutting force were observed for the SPI than SPC ($P < 0.001$). Starch gelatinization was lower in the diets with SPI than SPC ($P < 0.001$). The in vitro digestibility of OM was higher for the SPI than the SPC diet ($P = 0.04$).

During the processing of the diets with GM, lower motor amperage, extrusion temperature and 40% lower SME application were observed than for SPC ($P < 0.001$). This lower mechanical energy application explains the higher bulk density, specific density and cutting force and lower specific length for the GM kibbles compared with the SPC diets ($P < 0.001$). In addition, the degree of starch cook was lower for the GM than SPC ($P < 0.001$). The in vitro digestibility of OM of the diets with GM were similar with that of SPC. When

diets with SPI and GM were compared, SPI induced a higher elevation of the motor amperage, extrusion temperature, and SME transference ($P < 0.05$), kibbles with lower piece density ($P < 0.05$) and greater starch gelatinization ($P = 0.001$). The in vitro digestibility of OM for diets with SPI was similar to the diets with GM.

On the digestibility study, after coating with poultry fat and liquid palatant, the chemical composition of selected diets was similar (Table 8). All diets were readily consumed by dogs, without episodes of food refusal, diarrhea or vomiting. No differences on nutrient intake were observed during the digestibility test (Table 9). The experimental diets were generally highly digestible. The GM60 showed a higher coefficient of total tract apparent digestibility (**CTTAD**) of OM than SPC60, and similar to PBM and SPI ($P = 0.05$). The CTTAD of CP was higher for the GM60 when compared to PBM, and similar to SPI60 and SPC60 ($P = 0.004$), values of 91.8%, 89.0%, 90.9% and 90.6%, respectively. All the diets had higher digestibility of fat, but lower CTTAD were observed for SPI60 than for the other diets ($P < 0.001$). The metabolizable energy was higher for GM60 and similar for SPC60, SPI60 and PBM ($P = 0.01$).

Fecal production on as-is basis was higher for dogs fed the SPC60 diet ($P = 0.01$), as shown on Table 10. The fecal dry matter content and fecal pH was lower for dogs fed SPC60 ($P < 0.05$). The fecal score was higher for the SPI60 diet when compared to PBM, the other diets had similar values ($P = 0.02$). The only urinary parameter that changed was lower pH for dogs fed the GM60 diet compared with the other diets ($P = 0.001$).

DISCUSSION

Extrusion experiment

The independent variables feed rate, extruded screw speed, water and steam injection, cutting knife speed, die open area and productivity were constant for all treatments. Also, the

concentration of starch, widely used in pet foods due to its binding power (Rockey et al., 2010), was similar between diets (Table 3). Thus, the results of SME input and macrostructure of kibbles are due to functional characteristics of the ingredients used in this study. The substitution of PBM by soy proteins, in general, leads to an increased application of mechanical energy and in a greater expansion of kibbles (Tables 4 and 5). These can be attributed to the functional properties of the soy proteins, among them the water absorption capacity (**WAC**) and gel formation are closely related to the binding power of soybeans (Singh, 2010).

Proteins are more efficient gelling agents than carbohydrates as their large molecules form a three dimensions structure in which water is entrapped (Riaz, 2005; Moure et al., 2006). This ability of the gel structure is interesting not only to hold water, but also to hold fat, flavor and other food additives (Kinsella, 1979; Hettiarachchy and Kalapathy, 1994). Therefore, the absorption of water increases dough viscosity (Kinsella, 1979; Añón et al., 2001), requiring more engine power to carry it through the screw and raising SME transfer to dough due to greater friction inside the jacket (Miller, 1990; Sousa et al., 1996). Also, the WAC whether in starch granules or in protein networks improves the flash-off, which is the vaporization of internal water in contact with ambient pressure (Fellow, 2000; Chuang and Yeh, 2004), which explains the more expanded kibbles observed with the soy proteins (Tables 4 and 5).

Another important functional property of soybeans that justifies the increase in SME and expansion of the kibbles is the viscosity, defined as the resistance of a protein in solution to the flow (Deak, 2004). This is an important property for proteins when incorporated into foods like soups, beverages, pasta and meats. The high heat treatment during extrusion also increases the viscosity of the dough as it denatures the proteins, disrupting large protein

aggregates of the soy protein fractions (glycinin and β - conglycinin) (Kinsella, 1979; Wang and Johnson, 2001; Wang et al., 2008.).

Comparing SPC with SPI (Table 7), it is possible to verify that SPC promoted higher SME, higher starch cooking and greater kibble expansion than SPI. These differences occur because the SPI is more easily texturized with lower levels of energy input due to its higher protein level and higher protein dispersibility index (Kearns et al., 1989; Riaz, 2005). Also, the SPI present a homogeneous structure while those that contain SPC display an anisotropic structure with layers or coarse fibres in direction of flow (Cheftel et al., 1992; Akdogan, 1999).

Unlike soybean proteins, GM did not promote SME increase (Table 6), as the zeins that are the primary proteins of corn are hydrophobic (Kokini et al., 1994; Hamaker et al., 1995; Buchanan et al., 2000; Padua and Wang, 2002) with low WAC, low gelling and low viscosity. However, the inclusion of GM led to a quadratic increase of radial expansion rate, specific length and decrease of bulk density and piece density (Table 6). This increased expansion may be due to the presence of sulfur amino acids on GM who aids the cleavage of disulfide bonds, unraveling long twisted protein molecules (Kearns et al., 1989).

The linear increase in gelatinization of starch (Tables 4 and 5) according to the addition of SPC and SPI is directly related to the increase of SME transfer to mass which along with the presence of water in the granules will promote the cooking of the starch (Ilo et al., 1996). The GM inclusion did not show differences on starch gelatinization (Table 6) which is justified by SME, that did not increase with the use of GM. Furthermore, one factor that may have contributed to the SME responses is the proportionately reduction of internal fat content with the inclusion of soy sources, that could also favor SME implementation and product expansion.

Digestibility, fecal and urine characteristics of dogs

On the digestibility study, all experimental diets were generally highly digestible (Table 9). The higher CTTAD of soybeans proteins are consistent with those found on literature (Weirnuusz et al., 1995; Clapper et al., 2001; Felix et al, 2013) who reduced soybean oligosaccharide concentration through physical-chemical treatments and found an improvement in the CTTAD of CP in dogs. Also, the higher SME input observed with the substitution of PBM by SPC and SPI may have increased the protein digestibility of soy proteins as the increase in shear forces in the extruder denatures the proteins, facilitating enzyme hydrolysis (Bhattacharya & Hanna, 1985; Hendriks and Sritharan, 2002).

So far, no differences have been found in the literature regarding the high digestibility of GM in dog diets, the findings of this research are consistent with those found in the literature that attributes to GM high CTTAD of CP (Yamka et al., 2004; Sá Fortes et al., 2005; Carciofi et al., 2006), frequently being higher than PBM, probably due to wide variation in the quality of this raw material.

Lower fecal pH and higher moisture content for dogs fed with SPC60 (Table 10), indicates that the increased fecal production by dogs was likely due to higher fermentation activity in the colon. Although obtained after washing in ethanol to remove soluble carbohydrates and most of non digestible sugars like raffinose and stachyose, this raw material still contains around 20% of insoluble carbohydrates. These findings are consistent with those found by Felix et al. (2013) who found higher production of feces and lower dry matter in dogs fed SPC compared with SPI. Thus, in addition to improvements in CTTAD of nutrients it indicates that, within a limit consumption, these fermentable carbohydrates can bring benefits to the intestinal microbiota, since it induces the formation of short chain fatty acids (Maria et al., 2017).

Changes in pH urine observed on dogs fed GM60 (Table 10) are explained by the amino acid composition of the GM which is higher in methionine and cystine. When these

amino acids are metabolized during intermediary metabolism they are converted to sulfuric acid which reduces urine pH (Case et al., 2000).

CONCLUSION

The SPC and SPI promoted higher specific mechanical energy input, higher starch cooking and lower bulk density of kibbles than GM and PBM, due to its protein functional proprieties. The SPI, SPC and GM were ingredients with higher protein digestibility for dogs. Despite its purification, the results indicate that SPC still contains fermentable carbohydrates. The GM promoted a lower urine pH on dogs.

LITERATURE CITED

AAFCO. 2010. Association of American Feed Control Officials Incorporated: Official Publication. Assoc. Am. Feed Control. Off., Atlanta, GA.

Akdogan, H. 1999. High moisture food extrusion. *Int. J. Food. Sci. Technol.* 34(3):195-207. doi: 10.1046/j.1365-2621.1999.00256.x

Añón, M. C., D. A. Sorgentini and J. R. Wagner. 2001. Relationships between different hydration properties of commercial and laboratory soybean isolates. *J. Agric. Food. Chem.* 49(10):4852-4858. doi: 10.1021/jf010384s

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

- Bazolli, R. S., R. S. Vasconcellos, L. D. de-Oliveira, F. C. Sá, G. T. Pereira and A. C. Carciofi. 2015. Effect of the particle size of maize, rice and sorghum in extruded diets for dogs on starch gelatinization, digestibility, and the fecal concentration of fermentation products. *J. Anim. Sci.* 93:2956-296. doi: 10.2527/jas.2014-8409
- Camire, M. E. and C. King. 1991. Protein and fiber supplementation effects on extruded cornmeal snack quality. *J. Food Sci.* 56(3):760-763. doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb05376.x
- Carciofi, A. C., R. Pontieri, C. F. Ferreira and F. Prada. 2006. Avaliação de dietas com diferentes fontes proteicas para cães adultos. *R. Bras. Zootec.* 35(3):754-760. doi: 10.1590/S1516-35982006000300017
- Carciofi, A. C., F. S. Takakura, L. D. de-Oliveira, E. Teshima, J. T. Jeremias, M. A. Brunetto, and F. Prada. 2008. Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial glucose and insulin response. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 92(Issue 3):326-336. doi:10.1111/j.1439-0396.2007.00794.x
- Case, L. P., L. Daristotle, M. G. Hayek and M. F. Raasch. 2010. *Canine and Feline Nutrition-E-Book: A Resource for Companion Animal Professionals.* Elsevier Health Sciences.
- Cheftel, J. C., M. Kitagawa and C. Queguiner. 1992. New protein texturization processes by extrusion cooking at high moisture levels. *Food Reviews International.* 8(2):235-275. doi: 10.1080/87559129209540940

Clapper, G. M., C. M. Grieshop, N. R. Merchen, J. C. Russet, J. L. Brent Jr. and G. C. Fahey. 2001. Ileal and total tract nutrient digestibilities and fecal characteristics of dogs as affected by soybean protein inclusion in dry, extruded diets. *J. Anim. Sci.* 79:1523–1532. doi:10.2527/2001.7961523x

Cowell, C. S., N. P. Stout, M. F. Brinkmann, E. A. Moser and S. W. Crane. 2000. Making commercial pet foods. In: M. S. Hand, et al. (Ed). *Small animal clinical nutrition*. 4. ed. Kansas: Mark Morris Institute. p. 127-146.

Faller, J. Y., B. P. Klein and J. F. Faller. 1999. Acceptability of extruded corn snacks as affected by inclusion of soy protein. *J. Food Sci.* 64(1):185-188. doi: 10.1111/j.1365-2621.1999.tb09888.x

Félix, A. P., N. L. M. Rivera, T. T. Sabchuk, D. C. Lima, S. G. Oliveira and A. Maiorka. 2013. The effect of soy oligosaccharide extraction on diet digestibility, faecal characteristics, and intestinal gas production in dogs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 184(1):86-93. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2013.05.013

Fellows, P. J. 2009. *Food processing technology: principles and practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Funaba, M., Y. Oka, S. Kobayashi, M. Kaneko, H. Yamamoto, K. Namikawa, T. Iriki, Y. Hatano and M. Abe. 2005. Evaluation of meat meal, chicken meal, and corn gluten meal as dietary sources of protein in dry cat food. *Can. J. Vet. Res.* 69(4), 299-304.

Hendrix D. L. 1993. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. *Crop Sci. Madison*. 25:984-989. doi:10.2135/cropsci1993.0011183X003300060037x

Hervera, M., M. D. Baucells, F. Blanch and C. Castrillo. 2007. Prediction of digestible energy content of extruded dog food by in vitro analyses. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 91(5-6), 205-209. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00693.x

Hettiarachchy, N. S. and G. R. Ziegler. 1994. Protein functionality in food systems. CRC Press.

Hill, D. A. and D. Pas. 2004. Alternative proteins in companion animal nutrition. In *Pet Food Association of Canada Fall Conf.*, Toronto, Ontario.

Holm, J. I., A. Bjorck and N. G. Drews. 1986. A rapid method for the analysis of starch. *Starch-Stärke*, 38, 224-226.

Hoseney, R.C. 1994. Estimation of degree of cook (measurement of starch gelatinization). In R.R. McElhiney (Ed.), *Feed manufacturing technology IV* (p. 560-561). Arlington: AFIA.

Ilo, S., U. Tomschik, E. Berghofer and N. Mundigler. 1996. The effect of extrusion operating conditions on the apparent viscosity and the properties of extrudates in twin-screw extrusion cooking of maize grits. *LWT-Food Science and Technology*. 29(7):593-598. doi: 10.1006/fstl.1996.0092

Jideani, V. A. 2011. Functional properties of soybean food ingredients in food systems. In Soybean-Biochemistry, chemistry and physiology. InTech.

Joshi, A. U., C. Liu and S. K. Sathe. 2015. Functional properties of select seed flours. LWT-Food Science and Technology, v60(1):325-331. doi: 10.1016/j.lwt.2014.08.038

Karkalas, J. J. 1985. An improved enzymatic method for determination of native and modified starch. J. Sci. Food Agric. 36:1019-1027. doi: 10.1002/jsfa.2740361018

Kearns, J. P., G. J. Rokey, G. R. Huber and T. H. Applewhite. 1989. Extrusion of texturized proteins. In Proceedings of the world congress on vegetable protein utilization in human foods and animal feedstuffs. American Oil Chemists Society, Champaign. p. 353-363.

Kinsella, J. E. 1979. Functional properties of soy proteins. J. Am. Oil. Chem. Soc. 56(3):242-258. doi: 10.1007/BF02671468

Lin, M. J., E. S Humbert and F. W. Sosulski. 1974. Certain functional properties of sunflower meal products. J. Food Sci. 39(2):368-370. doi: 10.1111/j.1365-2621.1974.tb02896.x

Maria, A. P. J., L. Ayane, T. C. Putarov, B. A. Loureiro, B. P. Neto, M. F. Casagrande, M. O. S. Gomes, M. B. A. Glória and A. C. Carciofi. 2017. The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. J. Anim. Sci. 95(6):2452-2466. doi: 10.2527/jas.2016.1302

Meyer, H. and E. Kienzle. 1991. Dietary protein and carbohydrates: Relationships to clinical disease. In: Purina International Symposium. St Louis, MO. p. 13-26

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426-428. doi: 10.1021/ac60147a030

Miller, R. C. and S. Mulvaney. 1990. Unit operations and equipment IV. Extrusion and extruders. *Breakfast cereals and how they are made*, p. 135-193.

Mishra, S. and T. Rai. 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. *Food hydrocolloids*, 20(5):557-566. doi: 10.1016/j.foodhyd.2005.01.001

Moure, A., J. Sineiro, H. Domínguez and J. C. Parajó. 2006. Functionality of oilseed protein products: a review. *Food. Res. Int.* 39(9):945-963. doi: 10.1016/j.foodres.2006.07.002

NRC. 2006. Nutrient requirements of dogs and cats. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Ortiz, S. E. M. and J. R. Wagner. 2002. Hydrolysates of native and modified soy protein isolates: structural characteristics, solubility and foaming properties. *Food. Res. Int.* 35(6):511-518. doi: 10.1016/S0963-9969(01)00149-1

Rausch, K. D. and R. L. Belyea. 2006. The future of coproducts from corn processing. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 128(1):47-86. doi: 10.1385/ABAB:128:1:047

Riaz, M. N. 2000. Extruders in food applications, In: Riaz M. N. Introduction to extruders and their principles. CRC Press.

Riaz, M. N. Soy applications in foods. In: Strahm B. Meat Alternatives. Florida: Taylor & Francis, 2005 Cap.8, p. 135 a 154.

Riaz, M. N. 2007. Extruders and Expanders in Pet Food, Aquatic and Livestock Feeds. Agrimedia, Clenze, p.400.

Rokey, G. J., B. Plattner and E. M. Souza. 2010. Feed extrusion process description. R. Bras. Zootec. 39:510-518. doi: 10.1590/S1516-35982010001300055

Sá, F. C., R. S. Vasconcellos, M. A. Brunetto, F. O. R. Filho, M. O. S. Gomes, and A. C. Carciofi. 2013. Enzyme use in kibble diets formulated with wheat bran for dogs: effects on processing and digestibility. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 97(s1):51-59. doi: 10.1111/jpn.12047

Sá-Fortes, C. M. L. 2005. Valor nutricional de ingredientes energéticos e protéicos para cães. PhD. Thesis. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Singh, S., S. Gamlath and L. Wakeling. 2007. Nutritional aspects of food extrusion: a review. Int. J. Food. Sci. Technol. 42(8), 916-929. doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01309.x

Singh, G. 2010. The soybean: botany, production and uses. Cabi, p.404-425.

Sousa, I. M. N., P. J. Morgan, J. R. Mitchell, S. E. Harding and S. E. Hill. 1996. Hydrodynamic characterization of lupin proteins: Solubility, intrinsic viscosity, and molar mass. *J. Agric. Food Chem.* 44(10):3018-3021. doi: 10.1021/jf950516f

Tortola, L., N. G. Souza, L. Zaine, M. O. S. Gomes, L. F. O. Matheus, R. S. Vasconcellos, G. T. Pereira and A. C. Carciofi. 2013. Enzyme effects on extruded diets for dogs with soybean meal as a substitute for poultry by-product meal. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97(Suppl 1):39-50. doi:10.1111/jpn.12009.

Yamka, R. M., S. E. Kitts, A. D. True and D. L. Harmon. 2004. Evaluation of maize gluten meal as a protein source in canine foods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 116(3):239-248. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2004.06.007

Yamka, R. M., S. E. Kitts and D. L. Harmon. 2005. Evaluation of low-oligosaccharide and low-oligosaccharide low-phytate whole soya beans in canine foods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 120(1):79-91. doi: 10.2527/2005.832393x

Wang, X. S., C. H. Tang, B. S Li, X. Q. Yang, L. Li and C. Y. Ma. 2008. Effects of high-pressure treatment on some physicochemical and functional properties of soy protein isolates. *Food Hydrocolloids.* 22(4):560-567. doi: 10.1016/j.foodhyd.2007.01.027

Wang, C. and L. A. Johnson. 2001. Functional properties of hydrothermally cooked soy protein products. *J. Agric. Food. Chem.* 78(2):189-195.

Wiernusz, C. J., R. G. Shields, D.J. Van Vlierbergen, P.D. Kigin and R. Ballard. 1998. Canine nutrient digestibility and stool quality evaluation of canned diets containing various soy protein supplements. *Veterinary Clinical Nutrition*. 2:49-56.

Zuo, Y., G. C. Fahey Jr., N. R. Merchen, and N. L. Bajjalieh. 1996. Digestion responses to low oligosaccharide soybean meal by ileally-cannulated dogs. *J. Anim. Sci.* 74(10):2441-2449.

Table 1. Chemical composition and amino acid profile of protein sources used in the study
(g/100g of DM)

Item	Protein sources ¹			
	PBM	SPC	SPI	GM
Dry matter	91.38	92.62	95.31	91.17
Ash	14.30	6.31	4.19	1.60
Crude Protein	63.75	66.67	89.16	59.83
Amino acids				
<i>Essential</i>				
Alanine	4.10	2.55	3.09	5.73
Arginine	4.17	4.39	6.13	2.10
Histidine	1.26	1.64	2.05	1.39
Isoleucine	2.13	2.73	3.72	2.48
Lysine	3.83	3.87	4.91	1.20
Methionine	1.27	1.00	1.14	1.59
Phenylalanine	2.31	3.05	4.58	3.79
Threonine	2.58	2.39	2.81	2.18
Tryptophan	0.51	0.91	1.21	0.35
Valine	2.62	2.88	3.86	3.05
<i>No-essential</i>				
Aspartic Acid	4.89	6.92	9.08	3.88
Cysteine + Cystine	-	0.98	1.11	1.21
Glutamic Acid	8.18	11.00	15.20	13.60
Glycine	6.67	2.50	3.19	1.88
Hydroxyproline	1.99	< 0.05	< 0.05	< 0.05
Leucine	3.93	4.58	6.25	10.20
Proline	< 0.02	2.87	4.09	6.12
Serina	2.69	3.08	3.97	3.23
Tyrosina	1.62	2.14	2.90	3.15

¹ - PBM = poultry by-product meal; SPC = soy protein concentrate; SPI = soy protein isolate; GM = corn gluten meal.

Table 2. Ingredient composition (% as-fed basis) of the experimental diets for dogs with different inclusions of protein sources.

Item	Diets ¹									
	PBM	SPC			SPI			GM		
		20% ₂	40%	60%	20%	40%	60%	20%	40%	60%
Maize	55.53	54.59	52.76	50.94	56.62	56.62	56.69	53.70	50.83	48.18
Poultry by-product meal	30.90	23.20	15.70	8.10	22.90	15.10	7.40	23.40	16.00	8.40
Soybean Protein Concentrate	-	7.50	15.00	22.50	-	-	-	-	-	-
Isolated Soybean Protein	-	-	-	-	5.90	11.80	17.60	-	-	-
Corn gluten meal	-	-	-	-	-	-	-	8.40	16.70	25.10
Sugarcane fiber	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Vitamin and mineral premix ⁴	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Sodium chloride	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Potassium chloride	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45	0.45
Choline chloride	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28	0.28
Mold inhibitor ⁵	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Calcium carbonate	-	0.09	0.30	0.50	0.14	0.40	0.60	0.06	0.20	0.40
Dicalcium phosphate	-	0.05	0.77	1.49	0.07	0.81	1.54	0.16	1.00	1.85
Antioxidant ⁶	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04
<i>Added by coating</i>										
Poultry fat	7.70	8.70	9.60	10.60	8.50	9.40	10.30	8.50	9.40	10.20
Palatant ³	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00

¹ - PBM = poultry by-product meal; SPC = soy protein concentrate (Arcon, Archer Daniels Midland Company, Illinois, USA); SPI = soy protein isolate (Pro-Fam, Archer Daniels Midland Company, Illinois, USA); GM = Corn gluten meal (GM; Salus Comercio de Produtos de Saude e Nutricao Animal Ltda., Santo Antonio de Posse, Brazil).

² - Percentage of substitution of the dietary protein by the ingredient in study.

³ - Liquid Palatant, SPF do Brasil, Descalvado, Brasil.

⁴ - Addition per kg of product: Iron 100 mg; Copper 10 mg; Manganese 10 mg; Zinc 150 mg; Iodine 2 mg; Selenium 0.3 mg; Vitamin A 18,000 IU; Vit. D 1,200 IU; Vit. E 200 IU; Thiamin 6 mg; Riboflavin 10 mg; Pantothenic acid 40 mg; Niacin 60 mg; Pyridoxine 6 mg; Folic acid 0.30 mg; cyanocobalamin 0.1 mg.

⁵ - Mold Zap: Ammonium dipropionate, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda, Araucária, Brazil.

⁶ - Banox: butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and calcium carbonate. Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda, Araucária, Brazil

Table 3. Chemical composition of extruded diets for dogs with different protein sources.

Uncoated product, values on dry matter basis.

Item, %	Diets ¹									
	PBM	SPC			SPI			GM		
		20% ²	40%	60%	20%	40%	60%	20%	40%	60%
Dry matter	94.8	94.1	94.7	94.3	93.7	94.4	94.7	93.6	93.2	94.5
Ash	8.1	6.8	6.8	6.9	6.8	6.5	6.4	6.9	6.7	6.5
Crude protein	28.5	28.9	30.1	28.7	30.0	30.4	29.8	29.6	30.3	31.1
Acid-hydrolyzed fat	8.0	6.5	5.7	5.1	6.9	5.9	5.8	6.9	7.2	6.9
Starch	40.3	40.0	40.2	39.3	40.5	41.2	42.3	39.7	38.6	39.9

¹ PBM = poultry by-product meal SPC = soy protein concentrate; SPI = soy protein; GM = Corn gluten meal. 2 – percentage of substitution of the dietary protein by the ingredient in study.

Table 4. Processing parameters, kibble macrostructure traits, starch gelatinization and in vitro digestibility of extruded dog diets with different inclusions of Soy Protein Concentrate.

Item	PBM ¹	Protein replacement			SEM ²	P-value	Contrast ³	
		20%	40%	60%			Lin	Quad
<i>Pre conditioner</i>								
Temperature, °C	82.8	83.5	84.8	87.0	0.44	<0.001	<0.001	0.031
Output moisture, %	22.0	22.6	22.0	22.3	0.21	0.721	0.921	0.651
<i>Extruder</i>								
Engine amperage, A	45.7	48.6	49.2	51.5	0.59	<0.001	<0.001	0.377
Temperature, °C	125.5	131.5	130.5	140.3	1.38	<0.001	<0.001	<0.001
Pressure, MPar	4.83	4.75	4.32	4.65	0.76	0.099	0.117	0.141
In barrel moisture, %	24.8	24.6	24.1	24.5	0.19	0.717	0.568	0.468
Bulk density, g/L	419.3	386.0	335.0	328.0	9.75	<0.001	<0.001	<0.001
SME, kW-h/ton ⁴	17.1	19.7	22.1	24.9	0.76	<0.001	<0.001	0.840
<i>After dryer</i>								
Starch gelatinization, %	78.7	84.9	86.4	88.9	1.08	0.001	<0.001	0.107
Piece density, g/cm ³	0.51	0.45	0.39	0.39	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Radial expansion rate	10.9	12.0	12.4	12.2	0.08	<0.001	<0.001	<0.001
Specific length, mm/g	19.3	19.6	21.4	22.0	0.17	<0.001	<0.001	0.179
Cutting force, N	33.3	33.3	30.4	31.3	0.49	0.182	0.090	0.668
In vitro digestibility of OM	85.1	85.9	84.3	84.2	0.53	0.767	0.503	0.764

¹ - PBM - poultry by-product meal

² - SEM = standard error of the mean (n = 4 replicates per treatment)

³ - Linear or quadratic effect of the inclusion of the ingredient in study. The analysis was performed with the actual replacements of 18%, 35% and 53% of the dietary protein with SPC

⁴ - SME = specific mechanical energy

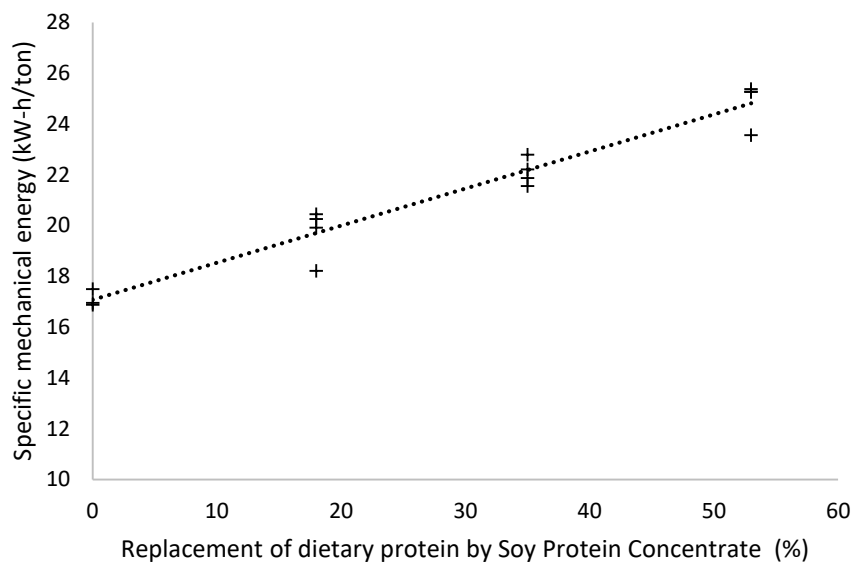


Figure 1. Specific mechanical energy as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Concentrate: $y = 0.146x + 17.075$; $r^2 = 0.95$; $P < 0.0001$.

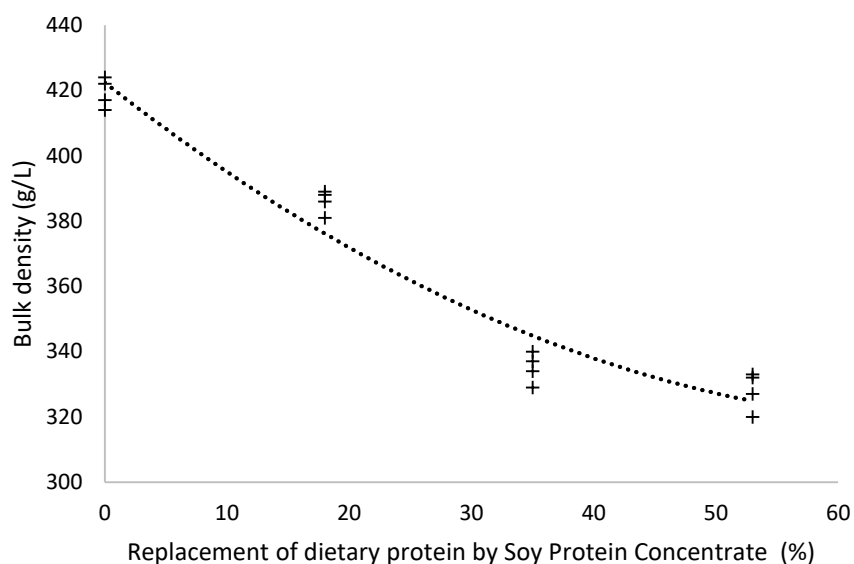


Figure 2. Bulk density as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Concentrate : $y = 0.0208x^2 - 2.9451x + 422.41$; $r^2 = 0.95$; $P < 0.001$.



Figure 3. Starch gelatinization as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Concentrate : $y = 0.1705x + 80.476$; $r^2 = 0.75$; $P = 0.0003$

Table 5. Processing parameters, kibble macrostructure traits, starch gelatinization and in vitro digestibility of extruded dog diets with different inclusions of Soybean Protein Isolate (SPI).

Item	PBM ¹	Protein replacement			SEM ²	P-value	Contrast ³	
		20%	40%	60%			Lin	Quad
<i>Pre conditioner</i>								
Temperature, °C	82.8	86.3	85.0	84.0	0.41	0.002	0.296	<0.001
Output moisture, %	22.0	21.0	22.3	23.5	0.34	0.083	0.049	0.088
<i>Extruder</i>								
Engine amperage, A	45.7	43.3	45.5	47.7	0.46	0.001	0.003	<0.001
Temperature, °C	125.5	129.0	127.0	122.0	0.71	<0.001	0.002	<0.001
Pressure, MPa	4.83	3.90	4.50	4.44	0.11	0.002	0.390	0.007
In barrel moisture, %	24.8	24.2	24.3	25.7	0.31	0.375	0.405	0.169
Bulk density, g/L	419.3	398.5	389.3	385.0	4.12	0.002	<0.001	0.118
SME, kW-h/ton ⁴	17.1	15.3	17.2	21.5	0.65	<0.001	<0.001	<0.001
<i>After dryer</i>								
Starch gelatinization, %	78.7	79.8	80.5	84.2	0.76	0.044	0.013	0.293
Piece density, g/cm ³	0.50	0.49	0.41	0.41	0.01	<0.001	<0.001	0.322
Radial expansion rate	10.9	11.3	13.2	12.6	0.18	<0.001	<0.001	0.037
Specific length, mm/g	19.3	19.1	19.5	20.4	0.13	<0.001	<0.001	0.002
Cutting force, N	33.3	37.2	35.3	35.3	0.69	0.112	0.233	0.091
In vitro digestibility of OM	85.1	85.6	86.5	86.9	0.40	0.457	0.153	0.932

¹- PBM - poultry by-product meal; SPI20 - replacement of 20% of the protein by Isolate Soybean Protein; SPI40 - replacement of 40% of the protein by Isolate Soybean Protein; SPI60 - replacement of 60% of the protein by Isolate Soybean Protein.

² - SEM = standard error of the mean (n = 4 replicates per treatment)

³ - Linear or quadratic effect of the inclusion of the ingredient in study. The analysis was performed with the actual replacements of 18%, 35% and 53% of the dietary protein with SPI

⁴ - SME = specific mechanical energy



Figure 4. Specific mechanical energy as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Isolate: $y = 0.0046x^2 - 0.1721x + 17.048$; $r^2 = 0.88$; $P < 0.0001$.

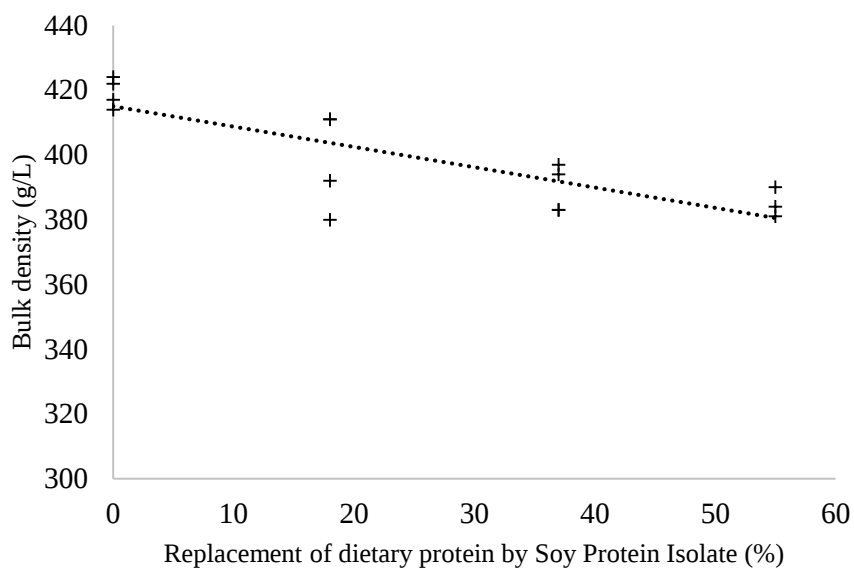


Figure 5. Bulk density as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Isolate : $y = - 0.6266x + 414.95$; $r^2 = 0.66$; $P = 0.0003$.

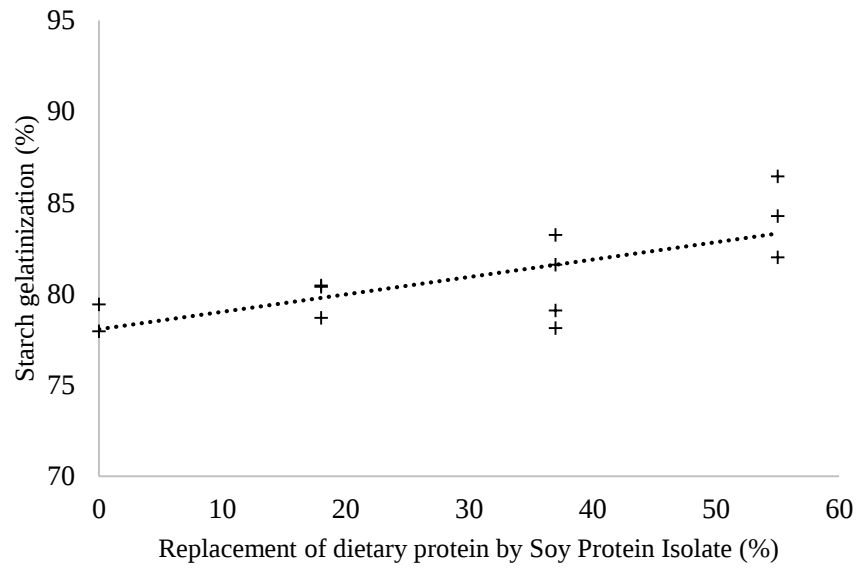


Figure 6. Starch gelatinization as a function of the percent of replacement of the dietary protein by Soy Protein Isolate : $y = 0.0954x + 78.054$; $r^2 = 0.51$; $P = 0.0089$.

Table 6. Processing parameters, kibble macrostructure traits, starch gelatinization and in vitro digestibility of extruded dog diets with different inclusions of Corn Gluten Meal.

Item	PBM ¹	Protein replacement			SEM ²	P-value	Contrast ³	
		20%	40%	60%			Lin	Quad
<i>Pre conditioner</i>								
Temperature, °C	82.8	83.3	83.0	83.0	0.10	0.390	0.635	0.275
Output moisture, %	22.0	22.6	22.6	22.8	0.24	0.737	0.303	0.740
<i>Extruder</i>								
Engine amperage, A	45.7	45.8	41.8	44.8	0.53	0.006	0.062	0.060
Temperature, °C	125.5	124.3	121.5	125.5	0.49	0.001	0.320	<0.001
Pressure, MPa	4.83	5.03	4.75	3.80	0.14	<0.001	<0.001	<0.001
In barrel moisture, %	24.8	24.6	24.6	24.8	0.21	0.976	0.993	0.692
Bulk density, g/L	419.3	396.0	430.3	372.5	6.08	<0.001	<0.001	0.002
SME, kW-h/ton ⁴	17.1	18.2	12.6	16.3	0.73	0.006	0.105	0.200
<i>After dryer</i>								
Starch gelatinization, %	78.7	77.3	78.4	76.2	0.61	0.499	0.308	0.733
Piece density, g/cm ³	0.50	0.47	0.49	0.38	0.01	<0.001	<0.001	<0.001
Radial expansion rate	10.9	12	11.3	13.1	0.14	<0.001	<0.001	0.029
Specific length, mm/g	19.3	18.8	19.0	21.0	0.21	<0.001	<0.001	0.001
Cutting force, N	33.3	38.2	39.2	30.4	0.69	<0.001	0.127	<0.001
In vitro digestibility of OM	85.1	86.9	85.5	85.9	0.43	0.599	0.783	0.494

¹- PBM - poultry by-product meal

² - SEM = standard error of the mean (n = 4 replicates per treatment)

³ - Linear or quadratic effect of the inclusion of the ingredient in study. The analysis was performed with the actual replacements of 18%, 35% and 53% of the dietary protein with GM.

⁴ - SME = specific mechanical energy

Table 7. Effects of different vegetable protein sources on the extrusion parameters and kibbles macrostructure of dog diets. Results of orthogonal polynomial contrasts of three inclusion amounts of each protein source.

Item	Mean results ¹			SEM ²	Contrasts ³		
	SPC	SPI	GM		SPC x SPI	SPC x GM	SPI x GM
<i>Pre conditioner</i>							
Temperature, °C	85.1	85.2	83.1	0.23	1.000	<0.001	<0.001
Output moisture, %	22.3	22.3	22.7	0.13	0.964	0.306	0.309
<i>Extruder</i>							
Engine amperage, A	49.9	45.3	44.1	0.43	<0.001	<0.001	0.011
Temperature, °C	134.1	126.4	123.8	0.85	<0.001	<0.001	<0.001
Pressure, MPa	4.60	4.25	4.34	0.07	0.346	0.498	0.749
In barrel moisture, %	24.4	24.7	24.7	0.14	0.377	0.474	0.850
Bulk density, g/L	349.7	391.5	399.6	4.43	<0.001	<0.001	0.016
SME, kW-h/ton ⁴	22.2	17.7	15.7	0.51	<0.001	<0.001	0.001
<i>After dryer</i>							
Starch gelatinization, %	86.6	81.4	77.3	0.73	<0.001	<0.001	<0.001
Piece density, g/cm ³	0.41	0.43	0.44	<0.01	<0.001	<0.001	0.033
Radial expansion rate	12.2	12.4	12.1	0.06	0.313	0.471	0.084
Specific length, mm/g	21.0	19.7	19.6	0.01	<0.001	<0.001	0.705
Cutting force, N	31.38	36.28	35.30	0.29	<0.001	<0.001	0.817
In vitro digestibility of OM	84.8	86.3	86.1	0.32	0.040	0.070	0.763

¹ - SPC: average result of the diets with 20%, 40% and 60% substitution of the diet protein by Soy Protein Concentrate; SPI: average result of the diets with 20%, 40% and 60% substitution of the diet protein by Soy Protein Isolate; GM: average result of the diets with 20%, 40% and 60% substitution of the diet protein by Corn Gluten Meal.

² - SEM = standard error of the mean (n = 4 replicates per treatment).

³ - SPC x SPI (SPC20% + SPC 40% + SPC 60% versus SPI 20% + SPI 40% + SPI 60%); SPC x GM (SPC20% + SPC 40% + SPC 60% versus GM 20% + GM 40% + GM 60%); SPI x GM (SPI 20% + SPI 40% + SPI 60% versus GM 20% + GM 40% + GM 60%);

⁴ - SME = specific mechanical energy

Table 8. Chemical composition of the extruded diets for dogs with different protein sources.

Composition of the finished product, after coating with poultry fat and palatant. Values on dry matter basis.

Item	Diets ¹			
	PBM	SPC60	SPI60	GM60
Dry matter, %	93.5	94.1	93.9	92.8
Ash, %	7.3	6.5	6.1	6.1
Crude protein, %	27.7	27.5	27.9	28.6
Acid-hydrolyzed fat, %	14.3	14.6	13.4	14.8
Crude fiber, %	3.3	3.5	2.6	2.7
Gross energy, kcal/g	4.9	4.9	4.9	5.0

¹ - PBM = poultry by-product meal; SPC60 = Soy Protein Concentrate (Arcon, Archer Daniels Midland Company, Illinois, USA) replaced 60% of diet protein; SPI60 = Soy Protein Concentrate (Pro-Fam, Archer Daniels Midland Company, Illinois, USA) replaced 60% of diet protein; GM60 = Corn gluten meal (Salus Comercio de Produtos de Saude e Nutricao Animal Ltda., Santo Antonio de Posse, Brazil) replaced 60% of diet protein.

Table 9. Nutrient intake, coefficients of total tract apparent digestibility and metabolizable energy of extruded diets for dogs with different protein sources.

Item	Diets ¹				SEM ²	P value
	PBM	SPC60	SPI60	GM60		
Nutrient intake, g/(dog · day) as-fed basis						
Dry matter	157.8	154.7	146.3	149.6	3.19	0.614
Crude protein	49.5	48.7	46.1	47.7	1.01	0.614
Acid-hydrolyzed fat	24.3	23.6	22.4	23.2	0.49	0.614
Crude fiber	5.5	5.4	5.1	5.3	0.11	0.616
Coefficient of total tract apparent digestibility, %						
Dry matter	82.1	82.0	83.1	83.6	0.33	0.260
Organic matter	86.6 ^{ab}	85.3 ^b	86.6 ^{ab}	87.7 ^a	0.32	0.055
Crude protein	89.0 ^b	90.6 ^{ab}	90.9 ^{ab}	91.8 ^a	0.32	0.004
Acid-hydrolyzed fat	93.5 ^b	95.2 ^a	91.6 ^c	94.0 ^{ab}	0.33	<0.001
Crude fiber	31.2 ^a	23.7 ^{ab}	6.5 ^c	14.0 ^{bc}	2.50	0.001
Gross energy	87.3	86.8	87.5	88.3	0.25	0.153
Metabolizable energy (kJ/kg as-fed basis)	16.74 ^b	16.74 ^b	16.74 ^b	17.15 ^a	0.08	0.015

¹ - PBM = poultry by-product meal; SPC60 = Soy Protein Concentrate replaced 60% of diet protein; SPI60 = Soy Protein Isolate replaced 60% of diet protein; GM60 = Corn gluten meal replaced 60% of diet protein.

² - SEM = standard error of the mean (n = 6 dogs per diet)

^{a,b,c} - Means in the same row without a common letter differ by Tukey test (P <0.05).

Table 10. Feces and urine production and characteristics of dogs fed extruded diets with different protein sources.

Item	Diets ¹				SEM ²	P value
	PBM	SPC60	SPI60	GM60		
Feces						
g/(kg·dog · day), as-fed basis	5.2 ^{ab}	6.2 ^a	5.0 ^b	4.8 ^b	0.18	0.015
g/(kg·dog · day), dry matter basis	2.3	2.2	2.3	2.0	0.06	0.206
Dry matter, %	43.8 ^a	34.8 ^b	46.1 ^a	40.9 ^{ab}	1.21	<0.001
Score	3.9 ^b	4.0 ^{ab}	4.0 ^a	4.0 ^{ab}	0.01	0.023
pH	6.6 ^a	6.0 ^b	6.5 ^a	6.4 ^{ab}	0.06	0.006
Urine						
ml/(kg·dog · day)	8.54	9.34	8.64	10.30	0.49	0.604
Specific gravity	1.032	1.035	1.033	1.035	0.01	0.370
pH	6.9 ^a	6.7 ^a	6.8 ^a	6.0 ^b	0.09	0.001

¹ - PBM = poultry by-product meal; SPC60 = Soy Protein Concentrate replaced 60% of diet protein; SPI60 = Soy Protein Isolate replaced 60% of diet protein; GM60 = Corn gluten meal replaced 60% of diet protein.

² - SEM = standard error of the mean (n = 6 dogs per diet)

^{a,b,c} - Means in the same row without a common letter differ by Tukey test (P <0.05).