

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – FMVZ

CAMPUS DE BOTUCATU

**Grãos de milho úmidos de destilaria na alimentação de bovinos Nelore:
Digestibilidade e parâmetros ruminais**

LAÍS DE AQUINO TOMAZ

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para a obtenção do
título de mestre

Botucatu-SP
Junho/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA- “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – FMVZ

CAMPUS DE BOTUCATU

**Grãos de milho úmidos de destilaria na alimentação de bovinos Nelore:
Digestibilidade e parâmetros ruminais**

LAÍS DE AQUINO TOMAZ
ZOOTECNISTA

Orientador: Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni
Co-orientadores: Prof. Dr. Cyntia Ludovico Martins
Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto

Botucatu/SP
Junho/2019

T655g

Tomaz, Laís de Aquino

Grãos de milho úmidos de destilaria na alimentação de bovinos Nelore: Digestibilidade e parâmetros ruminais / Laís de Aquino Tomaz. -- , 2019
70 p. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara,
Orientador: Mario De Beni Arrigoni
Coorientador: Cyntia Ludovico Martins; Otávio Rodrigues Machado Neto

1. Nelore (Zebu). 2. Alimentação e rações. 3. Bovinos - confinamento. 4.
Sub produtos. 5. fermentação ruminal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Laís de Aquino Tomaz nasceu em 3 de setembro de 1992 na cidade de Botucatu – SP, filha de Angela Maria de Aquino Tomaz e João Cláudio Tomaz da Silva. Graduiu-se em Zootecnia na Faculdade de Ciência Animal e Tecnologia (FCAT), Campus de Dracena pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” em 2016, sendo bolsista do Programa de Educação Tutorial(PET) pelo Ministério da Educação (MEC) e da Pró Reitoria de Pesquisa (PROPe), e em 2017 se matriculou no mestrado pelo programa de zootecnia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, como bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) sob orientação do Prof. Dr. Mário De Beni Arrigoni e co-orientação da Prof. Dra. Cyntia Ludovico Martins e Prof. Dr. Otávio Rodrigues Machado Neto.

DEDICO

*Primeiramente a Deus, que não me desamparou e se fez presente todos os minutos durante
essa etapa me conduzindo, iluminando e me fortalecendo;*

*Aos meus pais Angela Maria de Aquino Tomaz e João Cláudio da Silva, aqueles que me
presentearam com a riqueza dos estudos e fizeram de mim não apenas uma profissional, mas
sobretudo, um ser humano...Aqueles que não mediram esforços para me acompanhar e me
apoiar em cada decisão, mantendo-me firme diante dos obstáculos e me incentivando a
prosseguir em busca dos meu sonhos e ideais.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, que me delegaram uma das missões mais valiosas: VIVER, e Viver com dignidade! A partir disso, me abençoaram em cada etapa, iluminando meu caminho e me dando forças para ultrapassar cada obstáculo dessa jornada, com saúde, esperança, fé e coragem.

Aos meus pais, Angela Maria de Aquino Tomaz e João Cláudio Tomaz da Silva, Meu maiores exemplos de seres humanos. Obrigada por cada lição que me foi passada, Por me ensinar quais os valores, princípios, caráter que se deve ter; Por toda a dedicação com nossa família, por todo amor, preocupação, suporte, compreensão e paciência.

Aos meus avós, que mesmo sem ter oportunidade de estudar, sempre evidenciou a sua importância e sei o quanto torceram e esperaram por essa conquista.

A minhas irmãs, Camila e Aline Tomaz, com quem aprendo muito e sei que posso contar em qualquer ocasião. Acho que as nossas diferenças nos completam.

Minha sobrinha Nauá Sofia, um dos meu motivos pelo qual me esforço para servir de exemplo.

A toda minha família, por se fazer sempre presente, pelas orações e pelo apoio incondicional

Gostaria de agradecer ao meu professor e orientador, Prof. Dr. Mario Arrigoni, que me cedeu a oportunidade de trabalhar consigo, e me confiabilizou este projeto. A quem foi o primeiro zootecnista que me espelhei e serei sempre admirada pelo profissional e ser humano que és;

Obrigada pela paciência, (e que paciência), principalmente com a minha ansiedade, Obrigada por acreditar e me fazer acreditar no meu potencial e por todos os conselhos.

Aos meus co-orientadores: Prof. Dr. Cyntia Ludovico Martins e Prof. Dr. Otavio Machado Neto, obrigada pela amizade, apoio, considerações, elaboração e condução desse projeto, vocês foram muito importante.

A Prof. Dr. Jane Ezequiel, que cedeu o laboratório como o confinamento no setor de Estudos digestivos e metabólicos da UNESP de Jaboticabal para a realização deste trabalho, e por todas as tardes de conversas, conselhos, apoio e amizade; Assim como todos os estagiários e pós-graduandos que me auxiliaram na condução do mesmo, sem vocês, com certeza o caminho teria sido muito mais difícil, obrigada: Edivilson (Vivi), Rayanne, Sergio, Maria Carolina, João, Robson, Capão, Dita, Andressa, Julia, e o querido funcionário do setor Carlinhos.

Em especial, ao Prof. Dr. Antonio Faciola, que me aceitou durante um período de estágio na Universidade da Flórida. Obrigada por essa oportunidade maravilhosa, por todos os ensinamento, pela vontade excessiva de trabalhar e nos deixar trabalhar e nunca deixar de nos motivar. Foi muito bom poder trabalhar com sua equipe, que se tornaram grandes amigos e exemplos: Lorrayne, Eduardinho, Virginia, Hugo, Patricia, Xioxia, José Maria, Sarah, Jim, e os melhores estagiários: Richard, Bruna e Aon;

Ao Prof. Dr. Marcos Marcondes, por me orientar e ensinar nas análises estatísticas e na

interpretação dos resultados, da qual foi um ensinamento muito valioso. Obrigada pela atenção e disponibilidade!!

A república Rapidinha da UNESP/Jaboticabal e suas agregadas e agregados, Karine, Aurea, Paulinha, Fer, Ju Akamine, Kênia, Rodrigo, Ari, Giovanni, Thais, Maxwelder e Rodrigo, você com certeza fizeram parte desse projeto e me ajudaram a superar todos os momentos difíceis, obrigada pelo companheirismo e amizade em todos os momentos.

Em especial, agradeço a colaboração dos Colegas, Maria Betânia, Alex Veiga, Taina Ebúrneo e Mateus Ferreira, pelas ajudas no primeiro experimento em Botucatu, que muito me agregou para a continuidade desse projeto, assim como a ida de vocês nas coletas em Jaboticabal.

Agradeço ao Gabriel e Javier da UFLA pelos ensinamentos sobre a coleta omasal, assim como ao meus queridos amigos Fernando Drago e Amanda Bertani que se propuseram a ajudar durante a primeira coleta, muitíssimo obrigada!!

À Gisele e seus estagiários por toda a disponibilidade e auxílio com as análises no Laboratório de Bromatologia da FMVZ – UNESP. Obrigada por tudo!!!! Foi muito mais fácil com pessoas experientes e prestativas como vocês.

Aos funcionários do confinamento, Du, Wilson, Sidney que me aguentaram no confinamento e estavam sempre à disposição para ajudar durante os carregamentos de WDG; Aos funcionários do departamento de Melhoramento e Nutrição Animal em especial ao Carlão (*in memoriam*) e a Andressa por todos os serviços prestados sempre com muita paciência e atenção; As funcionárias da pós graduação Seila, Cláudia e Ellen, que muito colaboraram para me lembrar os meus prazos e me ajudaram com documentos, lembretes e outras mil informações importantes.

A Prof. Telma Berchieri e a pós doutoranda Juliana, responsável pelo laboratório do setor de digestibilidade da UNESP/Jaboticabal, por ceder espaço para a realização das análises de alantoina;

Ao Prof Paulo Mazza e o técnico Dr. Flavio Perna, da USP/Pirassununga, por ceder espaço para a realização das análises de ácido úrico;

A Luciana Castelar Tsuda do Laboratório da Esalq/USP, pela disponibilização e prestatividade com as análises de ácido graxo;

À empresa Cargill, na pessoa de Pedro Veiga, por ceder o produto estudado, assim como pela confiança em nós depositada;

A toda equipe do prof. Mario que me recebeu de braços abertos e sei que posso contar sempre que precisar: Lucas Miranda, Ramon (Benegrip), Taina (Patras), Alexandre (Xoxo), Carol Floret (Fêmea), Felipe Krieck, Maria Betânia, Gabriel (Nanico) e a galera do Nutrir!!!

Um agradecimento imenso a todos os meus amigos que me apoiaram em busca de mais essa realização, sou muito feliz por estar cercada de pessoas maravilhosas em minha vida, que buscam seus sonhos e nos incentivam a buscar os nossos e nos fazem pessoas

melhores. Obrigada pelas horas de psicologia, de diversão, de paciência: As minhas irmãs de sempre: Aline, Carol Cordeiro e Amanda Bertani, por todo apoio e desprender uma boa parte do tempo de vocês para preparar meu material de amostras; Á minha amiga Karine, que esteve presente em todos os momentos durante a condução deste experimento me dando do força e não me deixando abalar com os problemas, ganhei um ótimo presente por ter ido para Jaboticabal; A toda galera da Chicãozada que se faz presente diariamente e apesar da distância, a amizade e o companheirismo nunca se enfraquecem, as minha irmãs da rep Mulherama: Maria Julia, Géssica, Raiza, Capada, Juh Mara, Dani Bosco, que também estando em cidades e até países diferentes, nunca deixamos de torcer pelo sucesso e felicidade uma da outra. Aos amigos da pós graduação em Botucatu, João Paulo, Pablo, Bismark, Leone, obrigado pela parceria, horas de estudos e ensinamentos. Por fim, obrigada aos meus recentes, mas queridos e importantes amigos que fiz durante o estágio na Flórida e que me ensinaram muita coisa em tão pouco tempo: Richard, Bruna, Gabi, Jéssica, Ana, Matheus, Kleves, Felipe, Iago, Lucas, Mariana, Samantha, Stephen, Pedro, Elineide e Édipo.

Obrigada,

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – pela bolsa concedida (vigência 03/2017-03/2018) - Código de Financiamento 001.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, (FAPESP) pelas bolsas de estudo de pesquisa no brasil e no exterior concedidas (Processo 2017/21354-6 e 2018/18165-0, respectivamente).

PENSAMENTOS....

“Não fique com medo de começar de novo;
Dessa vez, você não está começando do zero...
Você está começando da experiência”

“Necessidades básicas:
Gentileza para transformar o dia em doçura;
Tolerância para olhar uma verdade diferente da sua;
Humildade para reconhecer suas responsabilidades, fraquezas e limitações!”

“Não deixe de orar nunca. Mesmo quando não ouvir a voz de Deus, Ele ainda ouve sua
vóz”

“Tudo começa a dar certo quando você cria o habito de acreditar em si mesmo; Não se
deixe pra depois.”

“Uma pequena tartaruga nunca sai do seu casco, está sempre protegida, não importa o
que aconteça...
Nada de ruim pode lhe acontecer...
Bom, mas nada de bom também, né?”

“Todo novo processo assusta, mas mais assustador é viver sempre a mesma coisa.”

“...Ninguém é melhor que todos nós junto”

“A ciência nunca resolve um problema se criar pelo menos outros dez.”

LISTA DE TABELAS

Table 1:Chemical composition of WDG:.....	37
Table 2: Experimental diets composition during sampling collection of finishing Nellore cattle.	38
Table 3: Dry Matter, nutrients intake and digestibilities of Nellore cattle fed level of WDG.....	43
Table 4: Feeding behavior variables of Nellore cattle fed with increasing levels of WDG.....	44
Table 5: Volatile fatty acids concentration and molar proportion of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).....	46
Table 6: Microbial protein synthesis variables of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).....	47

LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Dynamics of pH after morning feeding of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).	45
Figure 2: Dynamics of N-NH ₃ after morning feeding of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).	46

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	13
1. REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1 PROCESSAMENTO DOS GRÃOS DE DESTILARIA	16
1.2 AMBIENTE RUMINAL E FERMENTAÇÃO MICROBIANA EM BOVINOS ALIMENTADOS COM GRÃOS DE DESTILARIA	19
2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
1. Introduction	35
2. Material and methods	36
2.1 Animals and feed management.....	36
2.2 Collection period and experimental analyses	39
2.2.3 Evaluation of feeding behavior	39
2.2.4 Total digestibility	39
2.2.5 Microbial Protein Synthesis	40
2.2.6 Ruminal fermentation.....	41
2.3 Statistics Analysis.....	41
3. Results	42
3.1 Total digestibility	42
3.2 Feeding behavior	43
3.2 Ruminal fermentation	44
3.3 Microbial protein synthesis	46
4. Discussion	47
5. Conclusion.....	58
6. References.....	58

RESUMO

O uso de milho para produção de etanol tem aumentado no Brasil, assim como o uso de seus subprodutos como os grãos de destilaria (GD) na nutrição animal. Não há informações sobre o uso de grãos de destilaria úmido (WDG) em dietas de alta energia para bovinos da raça Nelore. Sendo assim, o experimento objetivou avaliar os efeitos dos níveis crescentes de WDG como substituto de farelo de soja e milho no consumo de matéria seca (CMS), digestibilidade total, parâmetros de fermentação ruminal e comportamento alimentar de bovinos de corte alimentados com dietas de terminação. Oito bovinos Nelore canulados no rúmen ($PC = 453 \pm 32$ kg) foram alocados em baias individuais e distribuídos em 4 tratamentos: T1: 0%; T2: 15%; T3: 30% e T4: 45% de WDG %MS, utilizando um delineamento com quadrado latino replicado 4x4. O período experimental foi de 112 dias, dividido por 4 períodos de 28 dias, sendo 14 dias de adaptação e 14 dias para as coletas experimentais. As dietas apresentaram uma relação concentrado: volumoso de 88:12. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software estatístico SAS 9.4, utilizando contrastes ortogonais sendo: linear, quadrático e cúbico com o procedimento PROC MIXED. Medidas repetidas no tempo foram utilizadas para as análises de parâmetros ruminais e todas as variáveis foram consideradas diferentes estatisticamente considerando um $P \leq 0,05$. O Consumo de matéria seca (CMS), consumo de matéria orgânica (CMO) e tempo de ruminação foram maiores para animais alimentados com 30% de WDG. O Consumo e digestibilidade da proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e a proporção molar de propionato foram melhores para animais que consumiram 45% de WDG; Entretanto, a ingestão e digestibilidade de carboidrato não fibroso(CNF), assim como a concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) diminuíram conforme aumentou-se os níveis de WDG, e em relação a síntese microbiana uma diferença estatística cúbica foi observada, onde os maiores níveis se apresentaram para as dietas controle e com 30% de WDG. Conclui-se que a níveis crescentes de grãos de destilaria úmido podem ser usados como substitutos ao farelo de soja e milho em dietas para bovinos Nelore confinados, pois não houve comprometimento do metabolismo com inclusão do subproduto, porém, mais pesquisas devem ser realizadas afim de se concretizar qual o melhor níveis de inclusão.

Palavras-chave: sub produto, etanol, metabolismo, dietas de terminação, Zebu

WET DISTILLERS GRAINS FED NELLORE CATTLE: DIGESTIBILITY AND RUMINAL PARAMETERS.

ABSTRACT

The use of corn for ethanol production has increased in Brazil, as such as the use of your byproducts as distillers grains (DG) for animal nutrition. There is no information about de-oiled wet distillers grains (WDG) (about 40 g of EE/kg of DM) in high-energy diets to Nellore cattle. Thus, the trial aimed to evaluate the effects of the increasing levels of WDG as replacement soybean meal and corn, on dry matter intake (DMI), total tract digestibility, ruminal fermentation parameters and feeding behavior of beef cattle fed finishing diets. Eight ruminally-cannulated Nellore (BW =453±32 kg) were allocated on individual pens and distributed in 4 treatments were: T1: 0%; T2: 15%; T3: 30% and T4: 45% of WDG on dry matter (DM) basis used in a 4x4 replicated Latin square design. The experimental period was 112 d, divided by 4 periods of 28d, being 14d of adaptation and 14d for the sampling and the diets presented a concentrated: forage ratio of 88:12. Statistical analyses were performed through SAS 9.4 statistical software, using orthogonal contrasts as linear, quadratic and cubic with PROC MIXED procedure. Repeated measures were considered for ruminal parameters and all variables were considered different with $p \leq 0.05$. Dry matter intake (DMI), organic matter intake (OMI) and rumination time was greater for animals fed 30% of WDG. Crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) intake and digestibility, even touch the molar proportion of propionate were better for 45% of WDG; However, NFC intake, digestibility and total volatile fatty acids (VFA) were decreased as long as the level of WDG increased. The efficiency of microbial protein synthesis observed a cubic difference, with the greater levels for the control diet and 30% of WDG-diets. We conclude that, increasing levels of wet distillers grains could be used as replacement soybean meal and ground corn, because ruminal fermentation and total tract digestibility of Nellore cattle were not compromised by WDG inclusion, in general; However, further investigation is necessary for to be able to indicate what is the best levels of inclusion.

Key words: by-product, ethanol, feedstuffs, metabolism, finishing-diets, Zebu

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O Brasil ocupa a segunda colocação no ranking mundial de bovinos, com efetivo rebanho estimado em 214,69 milhões de cabeças, sendo predominantemente advindos de um sistema extensivo, ou seja, uma alimentação a base de forragem. Recentemente, a pecuária brasileira tem passado por transformações visando intensificação da produção e aumento de produtividade com maior rentabilidade, sendo assim, uma das estratégias foi a adoção de um sistema intensivo de confinamento, que vem em uma crescente onde em 2017, o número de cabeças confinadas foi de 5,26 e em 2018 de 5,58 milhões (ABIEC, 2019).

O confinamento viabiliza o abate de animais mais jovens, com maior velocidade de ganho de peso em um curto período de tempo, acarretando em um melhor acabamento de carcaça e conseqüentemente uma carne de melhor qualidade. No processo de terminação, o sistema é baseado em uma oferta de dieta balanceada, onde a alimentação pode representar mais de 70% do custo total de produção e aproximadamente 2/3 estão representados pela fração concentrado. (RESTLE E VAZ,1999). Nos últimos anos, alavancado principalmente pelos oscilação dos preços das culturas de soja, milho e algodão, tem-se notado um aumento na utilização de outros ingredientes e subprodutos como forma de redução de custos, sem comprometimento do resultado do desempenho final.

Em um levantamento realizado por Pinto e Millen (2018), com nutricionistas brasileiros de confinamento, 70,6 % dos entrevistados utilizam algum subproduto para compor uma dieta de terminação; Nos Estados Unidos, um levantamento similar realizado por Samuelson et al (2016), reportou uma utilização de subproduto a base de grãos de 97,1%, sendo o grãos de milho úmido de destilaria [do inglês: *Wet distillers grains*

(WDG)] como o principal a ser utilizado em dietas de terminação (70,8%) seguido pelo grãos seco de destilaria [do inglês: *Dried distillers grains* (DDG)] com 16,7%. Ambos ingredientes são decorrentes da vasta produção de etanol a partir de grãos e crescente demanda americana, visto que em algumas ocasiões pode-se utilizar até 60% do WDG nas dietas dos bovinos. (LEUPP et al.,2009)

Nesse cenário, o Brasil é um dos maiores produtores mundiais de etanol, sendo a maioria proveniente da cana-de-açúcar, porém, o uso de grãos traduz o início de uma nova disponibilidade de biocombustível e segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), espera-se que a produção triplique ao longo dos três próximos anos. Informações da União da Indústria de cana-de-açúcar (ÚNICA, 2019) mostraram que a produção de etanol do milho aumentou em 50% em relação volume produzido na safra 2017/2018, somando 791,43 milhões de litros.

Segundo Vasconcelos e Galyean (2007), da moagem de milho e sorgo para produção de etanol resultam subprodutos de destilaria podem ser amplamente utilizados como fontes de proteína e energia para ruminantes e comumente são conhecidos como: DDG, WDG, DDGS e WDGS. A diferença entre esses compostos ocorre durante a fermentação do milho para a produção do etanol, que após um processo de separação da parte sólida e líquida são gerados os WDG e o CDS, ou solúveis de destilaria condensados (do inglês: *Condensed Distillers solubles*), respectivamente. Quando seco, o WDG passa a ser chamado de DDG. Entretanto, os CDS podem ser comercializados separadamente ou retornados a estas porções sólidas, originando o WDGS e DDGS.

Inicialmente os resíduos de destilaria foram utilizados como um substituto aos concentrados proteicos, com inclusão até 20%, pois apresenta em sua composição bromatológica cerca de 26 a 35% de proteína bruta (PB), elevada concentração de nutrientes digestíveis totais (NDT) correspondendo em média de 86,6 %, extrato etéreo

(EE) com média de 8 a 12% da MS e teor de fibra em detergente neutro (FDN) rica em hemicelulose, caracterizada pela alta digestibilidade ruminal, variando entre 30 a 50% (TJARDES, 2002); Valores estes estimados em até três vezes mais que o grão de milho, devido ao processo industrial onde aproximadamente 2/3 do amido é removido, restando em média 4,9%, sendo assim, aumenta-se a concentração dos nutrientes remanescentes. (Klopfenstein et al., 2008); Em níveis maiores de inclusão, é possível que o fornecimento do subproduto permita a redução na inclusão de milho, podendo contribuir ainda mais na redução do custo dietético final.

Além disso, segundo Kleinschmit et al. (2007), a proteína do grão de destilaria é moderadamente resistente à degradação ruminal, tornando-o uma excelente fonte de proteína não degradável no rúmen (PNDR). Os mesmos autores avaliaram várias fontes de grãos de destilaria com solúveis e encontraram valores de 53,6 a 71,4% de PNDR (%PB), resultando em uma ótima fonte de proteína metabolizável para ruminantes.

A utilização de milho para produção de etanol através de destilarias/usinas flex (produzem etanol a partir da cana ou milho), foi iniciada na atual década e vem se consolidando no mercado como uma opção para diminuir a ociosidade operacional das mesmas durante o período de entressafra da cana-de-açúcar (período de 90/120 dias por ano), facilitando o escoamento da produção do grão de milho. Além disso, a produção de etanol a partir do milho se mostra mais eficiente, pois para cada 1 tonelada de milho são produzidos 400 litros de etanol contra 85 litros advindos da cana-de-açúcar e não há necessidade de ser processado logo após a colheita, como ocorre com a cana-de-açúcar, onde o processo deve acontecer dentro das primeiras 24 horas. (SOBRINHO, 2012)

Uma das principais desvantagens da utilização de subprodutos é a grande variabilidade do seu conteúdo nutricional observado em diferentes usinas, em decorrência de diversos fatores como: a cultura do grão utilizado, os processos industriais específicos

de cada usina, a quantidade de vinhaça adicionada ao mosto e até formas de armazenamento interferem na da composição química do mesmo. (SPIEHS et al., 2002).

Além disso, em relação ao WDG e DDG, o grão úmido apresenta algumas vantagens nutricionais e econômicas quando manejado corretamente, pela maior concentração energética, aumento da disponibilidade da proteína, pois o aquecimento durante o processo de secagem pode causar indisponibilidade do nutriente, e um preço inferior por unidade de MS comparado com o DDGS (DOOLEY et al., 2008). Entretanto, pela maior quantidade de água, o custo de transporte e as dificuldades de manejo e armazenamento, podem impossibilitar ou limitar seu uso, para regiões próximas das plantas de etanol (LEMENAGER et al., 2006).

O fornecimento de grãos de destilaria para *Bos taurus* é consolidado, porém, não se tem trabalhos para *Bos indicus*, como os da raça Nelore e em clima tropical brasileiro, onde as dietas são compostas por milho tipo “Flint”, combinado geralmente com bagaço de cana como fonte volumosa, sendo este outro subproduto oriundo da produção de etanol. Sendo assim, em virtude do pequeno, porém promissor número de usinas que produzem etanol através do milho, é preciso consolidar a indústria e produção, além de explorar o conteúdo dos subprodutos e possibilitar uma indicação do nível mais adequado de inclusão em dietas para bovinos confinados, que favorecem o ambiente ruminal, impulsionando sua utilização e tornando a produção mais rentável aos produtores.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 PROCESSAMENTO DOS GRÃOS DE DESTILARIA

A produção mundial de etanol em 2017 foi de 102,206 bilhões de litros, onde Estados Unidos e Brasil, respondem por 60 e 26% do total da produção, respectivamente (RFA, 2018). Nos Estados Unidos, aproximadamente um terço do milho produzido é

destinado para a produção de etanol, no Brasil, a produção é crescente principalmente no estado do Mato Grosso, onde cerca de $\frac{1}{4}$ da oferta de etanol é oriunda do milho, o que representa uma oportunidade promissora, além de eficiente pois, para cada 3,8 litros de etanol produzidos são gerados 2,4 kg de DDGS de acordo com Bortoletto e Alcarde (2015).

O processo tradicional desta produção foi detalhado por Kim et al, (2008) e acontece quando o grão é moído a seco e é misturado com água quente formando o “mosto” passando por um processo de cozimento, com temperatura variando de 90 a 150 graus Celsius por 20 minutos e pH ajustado para 5,8 para que ocorra a geleificação do amido e atuação de enzimas para quebra do mesmo em açúcares simples. Em seguida, ocorre o processo de liquefação, com o mosto mantido a uma temperatura entre 80 e 90 graus Celsius por 90 minutos para adição da enzima alfa-amilase, convertendo o amido em oligossacarídeos. Após esse período, o mosto é resfriado por 45 a 90 minutos e a enzima glucoamilase é adicionada para a conversão dos oligossacarídeos em glicose. O mosto é então levado para os tanques de fermentação onde ocorre o abaixamento do pH para 4,5 em média, com adição de ácido sulfúrico, geralmente. Leveduras como da espécie *Saccharomyces cerevisiae* também são utilizadas para conversão da glicose em etanol e dióxido de carbono. O mosto então passa pelo processo de destilação, retirando a água presente e produzindo o etanol.

O resíduo da destilação é chamado de vinhaça, contendo sólidos não fermentáveis, leveduras, óleo e água, que através da centrifugação, a parte sólida é separada, resultando no WDG e a vinhaça remanescente é levada aos evaporadores, para remoção da água e extração de parte do óleo, originando o óleo de milho bruto. O restante do óleo constitui-se no CDS ou “xarope” (do inglês: *syrup*) com aproximadamente 20-35% de PB, 25% de EE e menos de 5% de fibra, sendo vendidos separadamente ou retornados a porção sólida,

originando o WDGS e após o processo de secagem, DDGS. Atualmente, em detrimento de altas concentrações de EE no produto final e novos comércios para o óleo de milho, pouca quantidade de CDS é adicionada de volta a porção sólida, resultando em um produto conhecido como low-fat (pouca gordura) W/DDG (*low fat wet or dried distillers grains*) ou *De-oiled distillers grains*.

Ao remover a gordura dos solúveis de destilaria com a tecnologia de centrifugação, o subproduto Low-fat Distillers Grains (LFDG) pode apresentar 30% menos gordura e 14% mais proteína em comparação com DDGS convencional (LÜKING; FUNSCH, 2009). Segundo Castillo-Lopez et al. (2014), os LFDG apresentam aproximadamente 5,5% de gordura.

Sabe-se que altos níveis de gordura na dieta pode deprimir a digestão da fibra e da matéria orgânica do trato total, aumentando o tempo de retenção no rúmen devido aos efeitos tóxicos sobre o crescimento de alguns microrganismos ruminais sensíveis (bactérias e protozoários celulolíticos, que degradam fibra) (Tamminga e Doreau, 1991; Hobson e Stewart, 1997). Esses efeitos interagem para a redução do desempenho geral do confinamento. Portanto, baixo teor de gordura dos DG pode atenuar os efeitos negativos da gordura na fermentação ruminal, apoiar a melhoria da função ruminal e, conseqüentemente, melhorar o consumo e a digestibilidade geral dos nutrientes, obtendo um desempenho de bovinos mais satisfatório. Além disso, a redução na concentração de enxofre em DG com baixo teor de gordura, como resultado de menos CDS adicionados à fração de destiladores, pode permitir maior inclusão deste novo produto em dietas de confinamento.

Kelzer et al. (2011) avaliando dietas de terminação à base de milho laminado a seco contendo 35% de DDG tradicional ou pobre em gordura (*low-fat DDGS*) para acabamento de novilhos não causaram diferenças no desempenho em confinamento ou

características de carcaça, porém animais que consumiram dietas com menos gordura, apresentaram maiores concentrações de ácido graxo de cadeia curta (AGCC), que pode ser consequência do crescimento aumentado de microrganismos (MO) ruminais como resultado da redução da gordura na dieta. Animais que consumiram o DDGS convencional, a concentração de nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) foi aumentada e a de AGCC foi diminuída.

Portanto, pesquisas básicas de fermentação são necessárias para determinar os efeitos da inclusão de grãos de destilaria em dietas de terminação na fermentação ruminal e na digestibilidade da ração e permitir uma melhor compreensão de seus efeitos potenciais no desempenho de bovinos de corte. Esta informação pode ajudar na criação de recomendações de alimentação para melhor utilizar este novo produto como alimento não só em confinamento, como em todos estágios de vida de ruminantes.

1.2 AMBIENTE RUMINAL E FERMENTAÇÃO MICROBIANA EM BOVINOS ALIMENTADOS COM GRÃOS DE DESTILARIA

O rúmen é uma câmara fermentativa que abriga uma das relações simbióticas mais bem sucedidas da natureza; Este possui condições ambientais de temperatura ($38\text{-}41^\circ\text{C}$), pH (5,5 a 7,2) umidade (85-90%) e ambiente anaeróbio que são adequadas para o desenvolvimento de diversas populações de MO que são responsáveis por processos de fermentação e digestão do alimento consumido pelos animais. Na fermentação, os MO fornecem AGCC e aminoácidos (AA) que serão aproveitados pelo ruminante como fonte de energia e proteína, respectivamente (RUSSELL E RYCHLIK, 2001).

As bactérias compõem a principal biomassa microbiana ruminal e podem ser selecionadas pelo padrão dietético. Por exemplo, bactérias celulolíticas, têm a habilidade de se aderir firmemente às partículas fibrosas e são prejudicadas em pH abaixo de 6, convertendo os carboidratos fermentados nas concentrações de acetato, propionato e

butirado na proporção de 70:20:10, respectivamente (TEIXEIRA e TEIXEIRA, 2001). Já as bactérias amilolíticas são as responsáveis pela degradação dos carboidratos não fibrosos (CNF) e quando em concentração abundante, a produção de ATP é maximizada (RUSSELL, 1988), pois a taxa de fermentação é acelerada e a produção de AGCC mais intensa, reduzindo o pH e maximizando a produção de propionato e alterando as concentrações para 40:40:20 (OWENS, 1998). O total de AGCC varia entre 60 e 150mM/mL de líquido ruminal, sendo estes ácidos reflexo da atividade microbiana e da absorção através das papilas ruminais.

Autores reportaram que a inclusão de WDG ou DDG sobre a produção de AGCC não foi alterada em relação a dieta controle (HAM et al., 1994; AL-SUWAIEGH et al., 2002). Porém, Arias (2015), encontrou maior concentração de ácidos graxos totais no líquido ruminal de bovinos alimentados com a dieta controle quando comparado a inclusão de 20% de WDG, justificando-se que o aumento da inclusão de WDG implica em redução na concentração de propionato no líquido ruminal, devido à baixa concentração de amido (2-5%), pois quase 100% do mesmo é retirado para a produção do etanol. O restante da produção do combustível se concentra em proteína, fibra e extrato etéreo, desse modo, a concentração ruminal de acetato e butirato pode aumentar conforme a inclusão dos grãos de destilaria.

May (2009), encontrou maior concentração de propionato e aumento da relação acetato: propionato (A:P) quando 25% de DDGS foi incluído na dieta. Corrigan (2009) ao substituir milho floculado por WDG no nível de 40% da MS da dieta em bovinos no período de terminação, verificou redução no teor de amido da dieta e aumento do FDN, justificando a relação reduzida de A:P. Já Leupp (2009) substituiu o milho quebrado por DDGS e a concentração ruminal de AGCC totais também foi reduzida com inclusão de até 60% do subproduto e o autor não observou diferenças significativas ($p>0,05$) para o

pH ruminal com a utilização de milho floculado ou laminado a seco, associado com os níveis de DDGS (15, 30,45 e 60%). Ham et al. (1994) alimentaram novilhos 40% WDGS, substituindo parcialmente milho laminado a 90% em dietas concentradas também não relataram diferenças na concentração total de AGCC e no pH quando comparados com novilhos consumindo dietas apenas com milho laminados a seco. De acordo com Corona et al., (2006), novilhos apresentam menor pH ruminal consumindo milho floculado do que os que recebem um dieta composta por milho laminado. O mesmo foi observado por Corrigan et al. (2009) testando níveis de 0 e 40% de WDGS, onde os valores de pH máximo do rúmen e a variação do pH foram menores em novilhos alimentados com 40% de WDGS comparados a dieta com ausência do subproduto. Essa mensuração se faz importante pois o pH ruminal pode privilegiar uma população microbiana, o que altera as funções no processo digestivo. De acordo com Hoover (1986), variações no pH de 6,8 para 6,0 reduz a digestibilidade da fibra; Por outro lado, as bactérias amilolíticas são ativas em condições mais ácidas, com pH ao redor de 5,8 (FURLAN et al, 2011).

A exigências proteicas de bovinos, se dá pelo papel fundamental na nutrição, está contida nos alimentos e é calculada como $N \times 6,25$ (assumindo teor de Nitrogênio na proteína de 16%), é composta por uma fração degradável no rúmen (PDR) e outra não degradável no rúmen (PNDR). A degradação proteica no rúmen é proveniente das enzimas proteases, peptidases e deaminases liberadas pelos MO que utilizam de peptídeos, AA e amônia para sintetizar proteína microbiana, que é a principal fonte de proteína metabolizável (PM) para ruminantes, podendo representar de 55 a 65% das exigências para bovinos confinados. A segunda principal fonte é a PNDR seguida da PB endógena. Portanto, em termos de adequação proteica, deve-se ter por objetivo suprir à quantidade de PDR para maximizar a síntese microbiana e reduzir os compostos nitrogenados livres (moléculas menores que a proteína que incluem peptídeos, aminas,

amidas, AAlivres, ácidos nucleicos, nitrato e amônia) e então completa-la com PNDR, para suprir as exigências de PM e otimizar o desempenho animal (BERCHIELLI, 2001).

A correta formulação de ração, a seleção dos grãos adicionados a dieta e o tipo de processamento afetam a fermentação ruminal e podem influenciar no aproveitamento do alimento pelos animais (SPIEHS et al., 2002). Desse modo, o teor de nutrientes e suas frações digestivas torna-se um desafio, principalmente ao utilizar os grãos de destilaria e outros subprodutos (farelo de soja, casca de soja e farelo de girassol), onde as concentrações de nutrientes variam frequentemente (TJARDES, 2002). Stock et al. (2000), considerou que resíduos de destilaria contêm níveis elevados de proteína de escape (PNDR); Avaliando o DDG e DDGS, o escape de proteína foi de 2,3 e 2,6 vezes maior que o farelo de soja, respectivamente e concluiu que um bom aporte de PNDR na dieta é interessante, uma vez que animais jovens submetidos à dietas de terminação para alto desempenho, apresentam maior exigência de PM.

Quando a velocidade de degradação da PB excede a utilização de compostos nitrogenados para a síntese microbiana, o excesso de amônia produzida no rúmen atravessa a parede ruminal e é absorvida na sua forma não ionizada (NH_3) e pode ser excretada via urina na forma de uréia; Entretanto, na forma ionizada (NH_4), o amônio não é absorvido pela parede ruminal. Sabe-se que a redução do pH ruminal favorece a ionização da amônia e reduz sua absorção, desse modo, a concentração de amônia pode ser usada como indicador de sua utilização no rúmen. Altas concentrações de amônia ruminal resultam em maior absorção líquida de nitrogênio amoniacal (N-NH_3) pelas paredes do rúmen, conversão em uréia e conseqüentes perdas através da excreção urinária (ASSIS et al., 2004).

Segundo Fujihara et al. (1987), é possível estimar a síntese microbiana por meio de derivados de purina (DP) na excreção urinária. Esses derivados de purinas excretados

pelos ruminantes podem ser usados para estimar o fluxo intestinal de proteína microbiana, uma vez que a excreção endógena de DP e a relação quantitativa entre a excreção e absorção já foi previamente determinada. (CHIZZOTI et al, 2004).

Ham et al. (1994) relatou diminuição de amônia ruminal quando grãos de destilaria foram incluídos na dieta, o que é consistente com as expectativas de diminuição da disponibilidade ruminal de fontes de nitrogênio nas dietas com maiores inclusões de WDG, em virtude da alta concentração de proteína não degradável no rúmen (PNDR), porém Leupp et al. (2014) e Luebbe et al (2012) não observaram diferenças nas concentrações de $N-NH_3$ adicionando DDG nas dietas de bovinos. Já Manthey et al. (2016) encontrou um aumento linear nos níveis de $N-NH_3$ em novilhas suplementadas com 30, 40 e 50% de DDGS, justificando a diminuição do amido e aumento da PB dietética. Leupp (2014) reportou aumento linear da digestibilidade do trato total quando suplementou-se novilhos com até 60% DDGS e Li et al (2014), também apresentaram tanto o consumo de PB como a digestibilidade, maior em novilhas suplementadas com DDG. Penner et al (2009), observaram aumento na produção de leite em vacas quando o WDGS substituiu a porção volumosa, assim como Anderson et al (2006), que reportou maior rendimento de PB do leite em vacas consumindo WDG, que neste caso foi incluso substituindo a porção concentrado, Ambos os autores justificaram pelo aumento do aporte de PNDR aumentando o fluxo de proteína metabolizável a ser disponível para os animais.

Em relação a ingestão e digestibilidade, Luebbe et al. (2012), avaliando níveis crescentes de WDGS (0, 15, 30, 45 e 60%) em substituição ao milho, observaram que o CMS respondeu de forma quadrática ($P < 0,01$) ao aumento da concentração do subproduto, onde o máximo CMS ocorreu nas concentrações de 15 e 30% de WDGS.

Em uma meta-análise de Vander Pol (2009), os níveis mais comuns de inclusão de WDGS foram 30 e 40%, mas as respostas foram quadráticas para as variáveis de ganho

de peso diário (GPD) e ingestão de matéria seca (IMS), sendo maximizadas com 30% do subproduto, e uma diferença numérica para aumento da digestibilidade do FDN com 40% de WDGS. Corrigan et al (2009), observou que a digestibilidade da FDN in situ foi maior em bovinos alimentados com dietas contando os grãos de destilaria em comparação a dietas a base de milho moído. Penner et al (2009), indicou que o WDG pode ser utilizado como substitutos de forragem ao reportar maior concentração de FDN no subproduto (56,48%) do que na silagem de cevada (45,57%) e Janicek et al (2008) relatou maior produção de leite em animais consumindo 30% DDGS. A partícula reduzida deste composto, seu conteúdo fibroso digestível capaz de aumentar a densidade energética mantendo as concentrações de FDN pode ser um dos indicativos que os grãos de destilaria podem diminuir a incidência de acidose (LARSON et al 1993; KLOPFENSTEIN et al, 2008), além disso, estudos reportam diminuição de carboidrato não fibroso (CNF), pela diminuição da quantidade de amido em dietas com DG. (LUEBBE ET AL., 2015; VANDER POL ET AL.2009 E UWITUZE ET AL.2010). Pinto e Millen (2018), reportaram que a acidose é o segundo maior distúrbio encontrado em confinamentos brasileiros, sendo o maior de ordem nutricional.

Anderson et al. (2015) ao suplementar novilhas com *Low-fat* DDGS (EE = 3,08%) e *High fat* (EE = 7,01%) em comparação ao controle (EE = 2,91%) também reportou diminuição da digestibilidade de CNF e amido, porém, a digestibilidade do EE foi aumentada, afirmando que até 8% de EE não compromete o desempenho.

Normalmente, a determinação da digestibilidade consiste em medir diretamente a quantidade de alimento ingerido e excreção fecal, sendo o rúmen o principal local onde há utilização e síntese de nutrientes a partir da dieta. O coeficiente de digestibilidade expressa a quantidade que cada nutriente o animal tem condição de utilizar, e segundo Forbes (1995), digestibilidade é o produto do tempo de retenção no rúmen pelas

características de degradação do alimentos. A determinação da digestibilidade por intermédio de ensaios de alimentação envolvendo a coleta total de fezes realizada no mínimo por três dias durante 24 horas é trabalhosa e onerosa (BERCHIELLI et al., 2001).

Outra avaliação importante é através da análise de comportamento ingestivo, compreendendo a variação na ingestão de alimento (DAMASCENO et al., 1999), que pode ser influenciado pelo tipo, quantidade e acessibilidade ao alimento, entre outros. (FISHER, 1996). Geralmente, são observados o tempo de alimentação, ingestão de água, ruminação, ócio e outras atividades (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al. 2011).

Em dietas baseadas na quantidade de grãos altamente fermentáveis, a IMS é regulada por sinais químicos, por meio de aumento da produção de AGCC, principalmente o propionato, que através do aumento do fluxo para ser metabolizado no fígado, pode diminuir o tamanho das refeições, sendo considerado como o principal ácido atuante na regulação de consumo, pela sua característica de hipofágia (ALLEN et al. 2009). Já o consumo de fibra é correlacionado com o tempo de mastigação, salivação e ruminação, influenciados pelo tamanho de partícula do volumoso; Partículas menores reduz o tempo de mastigação e consequente salivação e ruminação (VAN SOEST, 1994).

Swanson et al. (2014), avaliaram o grau de processamento do milho (laminado grosso ou laminado fino) e níveis de inclusão de DDGS de 20% e 40% da matéria seca da dieta e observaram que a diminuição do tamanho de partículas do milho associado ao aumento dos níveis de DDGS na dieta, resultou em redução da taxa de alimentação por refeição, assim como animais alimentados com 40% de DDGS ruminaram menos em pé, o que pode estar associado a mudanças no ambiente ruminal que interfere no comportamento alimentar. Porém, Corrigan et al (2009), mostrou uma maior taxa de alimentação ao incluir 40% de WDG combinado com milho floculado em relação a um dieta a base de milho laminado, com alta umidade ou floculado, sem adição de grãos de

destilaria.

Diferenças observadas nas características físicas e químicas dos subprodutos levam a alterações na capacidade de tamponamento ruminal e processos fermentativos sendo imprescindível avaliar os níveis ótimos de inclusão sob determinado processamento (úmido ou seco), tamanho de partícula, tipo de processamento de milho e da forragem, entre outros, garantindo um ambiente ruminal saudável e bem-estar animal.

Diante do exposto, o Capítulo 2, intitulado: “*Increasing levels of wet distiller’s grains on ruminal fermentation, total digestibility and feeding behavior of Nellore cattle fed high concentrate diets.*”, apresenta-se de acordo com as normas para a publicação no periódico *Animal feed Science and technology*. O objetivo desse estudo foi a inclusão de níveis crescentes de grãos de destilaria úmido no consumo de matéria seca, comportamento ingestivo, digestibilidade total e parâmetros ruminais de bovinos Nelore consumindo dietas de alto teor de concentrado.

2. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC. Associação Brasileira dos Exportadores de carne. 2019. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/Sumario2019.aspx>

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 83, p. 1598-1624, 2000.

AL-SUWAIEGH, S. et al. Utilization of distillers grains from the fermentation of sorghum or corn in diets for finishing beef and lactating dairy cattle. *Journal of Animal Science*, v.80 p.1105–1111, 2002.

ANDERSON, J. L.; KALSCHEUR, K. F.; GARCIA, A. D.; SCHINGOETHE, D. J. Feeding fat from distillers dried grains with solubles to dairy heifers: I. Effects on growth performance and total-tract digestibility of nutrients. *Journal of dairy science*, v. 98, n. 8, p. 5699-5708, 31, 2015.

ANDERSON, J. L.; SCHINGOETHE, D. J.; K. F. KALSCHEUR, K. F.; HIPPEN, A. R. Evaluation of dried and wet distillers grains included at two

concentrations in the diets of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 89, n. 8, p. 3133-3142, 2006.

ARIAS, R. P. et al. Effects of feeding corn modified wet distillers grain plus solubles co-ensiled with direct-cut forage on feedlot performance, carcass characteristics, and diet digestibility of finishing steers¹. *Journal of Animal Science*. v. 90, p. 3574-3583, 2015.

ASSIS, A. J. et al. Polpa cítrica em dietas de vacas em lactação. Digestibilidade dos nutrientes em dois períodos de coleta de fezes, pH e nitrogênio amoniacal do líquido ruminal. *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, MG, v. 33, n. 1, p. 251-257, 2004.

BERCHIELLI, T.T; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de Ruminantes*. 2a. ed. Funep. Jaboticabal, p. 483, 2011.

BORTOLETTO, A. M.; ALCARDE, A. R. Dominante nos EUA, etanol de milho é opção, no Brasil, para safra excedente. 13. ed. Piracicaba: Visão Agrícola. p. 3. 2015

BUCKNER, C. D., WILKEN, M. F.; BENTON, J. R.; VANNESS, S. J.; BREMER, V. R.; KLOPFENSTEIN, T. J.; KONONOFF, P. J.; ERICKSON, G. E. Nutrient variability for distillers grains plus solubles and dry matter determination of ethanol byproducts. *Professional, Animal Scientist*, v. 27, p. 57–63, 2011.

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

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of technical details. Bucksburnd: Rowett Research Institute, International Feed Resources Unit, 21p. (Occasional publication). 1992.

CHIZZOTTI, M. L. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de uréia e derivados de purinas em novilhas de diferentes pesos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.35, n.4, p.1813-1821, 2004.

COE, M. L. et al. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *Journal of Animal Science*, Champaing, v. 77, p.2259-2268, 1999.

CONAB. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento de safra brasileiro – grãos: Nono levantamento, junho 2019 – safra

2018/2019. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2019. Disponível em: Acesso em: 11 jul. 2019. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos>

CORONA, L.; OWENS, F.N.; ZINN, R.A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. *Journal Animal Science*, v. 84, p. 3020–3031, 2006.

CORRIGAN, M. E.; ERICKSON, G. E.; KLOPFENSTEIN, T. J.; LUEBBE, M. K.; VANDER POL, K. J.; MEYER, N. F.; BUCKNER, C. D.; VANNES, S. J.; HANFORD, K. J. Effect of corn processing method and corn wet distillers grains plus solubles inclusion level in finishing steers. *Journal of animal science*. v. 87, n. 10, p. 3351-3362, 2009.

DAMASCENO, J.C.; BACCARI JÚNIOR, F.; TARGA, L.A. Respostas comportamentais de vacas holandesas, com acesso à sombra constante ou limitada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.34, p.709-715, 1999.

DOOLEY, F. J., M. COX, and L. COX. Distillers grain handbook: A guide for Indiana producers to using DDGS for animal feed. A report for the Indiana Corn Marketing Council. 2008

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations/Statistics division. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/download/Q/QL/E> , Acesso em: jun de 2019

FORBES, J.M. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. 1. ed. Leeds: CAB International, p. 532, 1995.

FUJIHARA, T. et al. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. *Journal Agricultural Science*, v. 109, p. 7- 12, 1987.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.). *Nutrição de ruminantes*. 2. ed. Jaboticabal: Funep, p. 1 – 25, 2011.

HAM G.A. et al., Wet corn distillers byproducts compared with dried corn distillers grains with solubles as a source of protein and energy for ruminants. *Journal of Animal Science*, 72:3246–3257, 1994.

HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. The rumen microbial ecosystem. London: Blackie Academic and Professional, p. 340, 1997

HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal of Dairy Science*, v. 69, n. 10, p. 2755-2766, 1986.

JANICEK, B. N., KONONOFF, P. J., GEHMAN, A. M., and DOANE, P. H. The Effect of Feeding Dried Distillers Grains Plus Solubles on Milk Production and Excretion of Urinary Purine Derivatives. *Journal of Dairy Science*, 91(9), 3544–3553, 2008

KELZER, M. ; POPOWSKI, J. M. ; BIRD, S. ; COX, R. B. ; CRAWFORD, G. I. ; DICOSTANZO, A.,. Effects of including low fat, high protein dried distillers grains in finishing diets on feedlot performance and carcass characteristics of beef steers. University of Minnesota Beef Report Publication BR-1104, 2011
<https://www.auri.org/assets/2013/07/AIC-125.7.13.LFDDGS.pdf>

KIM, Y.; HENDRICKSON, R.; MOSIER, N. S.; LADISCH, M. R.; BALS, B.; BALAN, V.; COTTA, M. A. Effect of compositional variability of distillers' grains on cellulosic ethanol production. *Bio resource technology*, v. 101, n. 14, p. 5385-5393, 2010.

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; EZEJI, T.; BLASCHEK, H.; DIEN, B.; COTTA, M.; DALE, B.; LADISCH, M. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. *Bioresource technology*, v. 99, n 12, p. 5165–5176, 2008.

KLEINSCHMIT, D. H.; ANDERSON, J. L.; SCHINGOETHE, D. J.; KALSCHUR, K. F.; HIPPEN, A. R. Ruminal and intestinal digestibility of distillers grains plus solubles varies by source. *Journal of Dairy Science*, v. 90, p. 2909–2918, 2007

KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; BREMER, V. R. BOARD-INVITED REVIEW: Use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *Journal of animal science*, v. 47, n. 5, p. 1223-1231, 2008.

KLOPFENSTEIN, T. J.; ERICKSON, G. E.; BREMER, V. R. Feeding corn milling byproducts to feedlot cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 23, n. 2, p. 43, 223-245, 2007.

LARSON, E. M., R. A. STOCK, T. J. KLOPFENSTEIN, M. H. SINDT, and R. P. Huffman. Feeding value of wet distillers by products for finishing ruminants. *Journal of Animal Science* v 71, p 2228–2236, 1993.

LEMENAGER, R. P., T. APPLGATE, S. DONKIN, T. JOHNSON, S. LAKE, M. NEARY, S. RADCLIFFE, B. RICHERT, A. SCHINCKEL, M. SCHUTZ, AND A. SUTTON. The value of distillers' grains as a livestock feed. Purdue University Cooperative Extension Service, West Lafayette, IN. 2006.

LEUPP, J. L., G. P. LARDY, K. K. KARGES, M. L. GIBSON, AND J. S. CANTON. Effects of increasing level of corn distillers dried grains with solubles on intake, digestion, and ruminal fermentation in steers fed 70% concentrate diets. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 9, p. 28, 2906–2912, 2009

LI, Y.L., MCALLISTER, T.A., BEAUCHEMIN, K.A., HE, M.L., MCKINNON, J.J., YANG, W.Z. Substitution of wheat dried distillers grains with solubles for barley grain or barley silage in feedlot cattle diets: Intake, digestibility, and ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*. 89, 2491–2501, 2011.

LUEBBE, M.K., PATTERSON, J.M., JENKINS, K.H., BUTTREY, E.K., DAVIS, T.C., CLARK, B.E., MCCOLLUM, I.T., COLE, N.A., MACDONALD, J.C., 2012. Wet distillers grains plus solubles concentration in steam-flaked-corn-based diets: Effects on feedlot cattle performance, carcass characteristics, nutrient digestibility, and ruminal fermentation characteristics. *Journal of Animal Science*. v. 90, p. 1589–1602, 2012.

LÜKING, B.; FUNSCH, K. Corn oil extraction in dry mill ethanol plants using high speed centrifuges. *Proc. 5th Eur. Bioethanol Tech. Meet.*, Detmold, Germany, 2009

MAY, M. L.; QUINN, M. J.; REINHARDT, C. D.; MURRAY, L.; GIBSON, M. L.; KARGES, K. K.; DROUILLARD, J. S. Effects of dry-rolled or steam-flaked corn finishing diets with or without twenty-five percent dried distillers grains on ruminal fermentation and apparent total tract digestion. *Journal of animal science*, v. 87, n. 11, p. 3630-3638, 2009.

OWENS, F. N., D. S. SECRIST, W. J. HILL, D. R. GILL. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science*, 1998.

PENNER, G.B., YU, P., CHRISTENSEN, D.A., Effect of replacing forage or concentrate with wet or dry distillers' grains on the productivity and chewing activity of dairy cattle. *Animal Feed Science and Technology*, v. 3, p. 1–10. 2009.

PINTO, A. C. J., AND MILLEN, D. D. Nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists: the 2016 brazilian survey. *Canadian Journal of Animal Science*. 2018

RESTLE, J.; VAZ, F.N. Confinamento de bovinos definidos e cruzados. In: LOBATO, J.F.P.; BARCELLOS, J.O.J.; KESSLER, A.M. (Eds.) *Produção de bovinos de corte*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p.141-198. 1999.

RFA. *Annual Ethanol Industry Outlook*, Renewable Fuels Association, Washington, DC. 2018.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 11, p. 34, 3551-3561, 1992.

RUSSELL, J.B.; RYCHLIK, J.L. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*. v.292, p.1119-1122, 2001.

SAMUELSON, K. L.; HUBBERT, M. E.; GALYEAN, M. L.; LÖEST, C. A. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2015 New Mexico State and Texas Tech University survey. *Journal of Animal Science*, Champaign, v. 94, p. 2648-2663, 2016.

SCHINGOETHE, D. J.; KALSCHEUR, K. F.; HIPPEN, A. R.; GARCIA, A. D. Invited review: The use of distillers products in dairy cattle diets. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 12, p. 10, 5802-5813, 2009.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; HICKMAN, D. D.; SHAH, M. A.; KREHBIEL, C. R.; GENSWEIN, B. M. A.; SILASI, R.; MCALLISTER, T. A. Relationship between feeding behavior and performance of feedlot steers fed barley-based diets. *Journal of animal science*, v. 89, n. 4, p.1180-1192, 2011.

SOBRINHO, P. Processo (simplificado) de produção de etanol de milho – Destilaria/Usina Flex– Abordagem descritiva novo potencial. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento/ Superintendência regional de Mato Grosso, Cuiabá/MT, Mar, 2012.

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

STOCK, R. A. et al. Review of new information on the use of wet and dry milling feed by-products in feedlot diets. *Journal of Animal Science*, v.77, p. 1-12, 2000.

SWANSON, K. C.; ISLAS, A.; CARLSON, Z. E.; GOULART, R. S.; GILBERY, T. C.; BAUER, M. L. Influence of dry-rolled corn processing and increasing dried corn distillers grains plus solubles inclusion for finishing cattle on growth performance and feeding behavior. *Journal of animal science*, v. 92, n. 6, p.2531-2537, 2014.

TAMMINGA, S.; DOREAU, M. Lipids and rumen digestion. In: JOUANY, J.P. (Ed.) *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris: Institut National de la Recherche Agronomique. p.151-164, 1991

TEIXEIRA, J.C.; TEIXEIRA, L.F.A.C. Princípios de nutrição de bovinos leiteiros. Lavras: UFLA/FAEP, 245p. 2001.

TJARDES, K. Feeding Corn Distiller's Co-Products to Beef Cattle. 2002. Extension Extra. Paper 61. http://openprairie.sdstate.edu/extension_extra/61

ÚNICA. (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇUCAR). Relatório quinzenal de safra 2018/2019. Disponível em: Acesso em: 11 jul. 2019. <http://www.unicadata.com.br/index.php?idioma=1>

UWITUZE, S.; PARSONS, G. L.; SHELOR, M. K.; DEPENDBUSCH, B. E.; KARGES, K. K.; GIBSON, M. L.; REINHARDT, C. D.; HIGGINS, J. J.; DROUILLARD, J. S. Evaluation of dried distillers grains and roughage source in steam-flaked corn finishing diets. Journal of animal science, v. 88, n. 1, p. 258-274, 2010.

VAN SOEST, P. J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476p., 1994.

VANDER POL, K.J., LUEBBE, M.K., CRAWFORD, G.I., ERICKSON, G.E., KLOPFENSTEIN, T.J. Performance and digestibility characteristics of finishing diets containing distillers grains, composites of corn processing coproducts, or supplemental corn oil. Journal of Animal Science, v. 87, p. 639–652, 2009.

VASCONCELOS, J. T., E GALYEAN, M. L. Nutritional recommendations of feedlot consulting nutritionists: The 2007 Texas Tech University survey¹. Journal of Animal Science, v. 10, p. 2772–2781, 2007.

CAPÍTULO II

**O artigo a seguir está redigido conforme as
normas de publicação do periódico *Animal Feed Science and Technology*.**

Increasing levels of wet distiller's grains on ruminal fermentation, total digestibility and feeding behavior of Nellore cattle fed high concentrate diets.

ABSTRACT: The use of corn for ethanol production has increased in Brazil, as such as the use of your byproducts as distillers grains (DG) for animal nutrition. There is no information about de-oiled wet distillers grains (WDG) (about 40 g of EE/kg of DM) in high-energy diets to Nellore cattle. Thus, the trial aimed to evaluate the effects of the increasing levels of WDG as replacement soybean meal and corn, on dry matter intake (DMI), total tract digestibility, ruminal fermentation parameters and feeding behavior of beef cattle fed finishing diets. Eight ruminally-cannulated Nellore (BW =453±32 kg) were allocated on individual pens and distributed in 4 treatments were: T1: 0%; T2: 15%; T3: 30% and T4: 45% of WDG on dry matter (DM) basis used in a 4x4 replicated Latin square design. The experimental period was 112 d, divided by 4 periods of 28d, being 14d of adaptation and 14d for the sampling and the diets presented a concentrated: forage ratio of 88:12. Statistical analyses were performed through SAS 9.4 statistical software, using orthogonal contrasts as linear, quadratic and cubic with PROC MIXED procedure. Repeated measures were considered for ruminal parameters and all variables were considered different with $P < 0.05$. Dry matter intake (DMI), organic matter intake (OMI) and rumination time was greater for animals fed 30% of WDG. Crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) intake and digestibility, even touch the molar proportion of propionate were better for 45% of WDG, however, NFC intake, digestibility and total volatile fatty acids (VFA) were decrease as long as the level of WDG increase. We conclude that, 30 and 45% of wet distillers grains inclusion could be used as replacement soybean meal and ground corn, because ruminal fermentation and total tract digestibility

of Nellore cattle were not compromised by WDG inclusion,; However, further investigation is necessary for to be able to indicate what is the best levels of inclusion.

Key words: by-product, feedstuffs, metabolism, finishing-diets, Zebu

1. INTRODUCTION

In recent years, ethanol production using corn has increased in the mid-west region of Brazil, resulting in greater availability of distillers grains (DG), the primary by-product of this industry. This process results in: WDG (wet distillers grains), DDG (dried distillers grains) or WDGS and DDGS (wet/dried distillers grains with soluble) by adding condensed distillers soluble (CDS. Due to the majority of starch in the grain being fermented and to the overall fermentation process, the end-product is relatively more concentrated in protein, fat and fiber, containing on average of 26 to 35% of Crude Protein (CP), 8 to 12% of fat, 30 to 50% of neutral detergent fiber (NDF), and around 86% of total digestible nutrients (TDN). (Tjardes, 2002). Therefore, distillers grains can be included in diets to partially or completely replace energy or protein source (Klopfenstein, 2008).

Ham et al. (1994) evaluating steers fed dry rolled corn (DRC) as a control diet or 40% of WDGS, partially replacing DRC-diet, reported no differences in pH or total volatile fatty acids (VFA) concentration. However, Vander Pol et al. (2009) observed lesser ruminal acetate concentration, greater ruminal propionate concentration, and lesser ruminal acetate: propionate ratio (A:P) in steers fed 40% corn WDGS than steers fed a DRC-based control diet. Corrigan et al (2009), evaluating 0 or 40% of WDGS for steers, found greater dry matter intake (DMI), organic matter (OMI), neutral detergent fiber (NDFI) and ether extract (EEI) for animals fed WDGS, but had no differences for the total nutrients digestibility. Those results showed that, in general, there is no negative

effects on metabolism when DG is used as replacement of concentrate diets for finishing cattle. Besides that, Luebbe et al. (2012), evaluating increasing levels of WDGS (0, 15, 30, 45 and 60%) in replacement of corn, observed a quadratic response being the 15% and 30% the higher DMI. Trenkle (1997), reported decreased of 10% of DMI compared animals fed 45% of WDG in relation to 30% WDG. The reduction of the DMI could be associated with high dietary fat in traditional by-products (10-12% of EE).

Recently, a new method leave less residual oil (de-oiled), resulting in a by-product “low-fat” (LF), attenuating negative effects of high dietary fat, and can allow improvement of feed intake, rumen function and nutrient digestibility (Kelzer et al, 2011). Furthermore, no previous research has evaluated this de-oiled by-product for Brazilian conditions, when used in a diet in combination with “flint” corn and sugarcane bagasse for Nellore finishing cattle. Further investigation determining the optimal inclusion rates of wet distillers grains as a partial concentrate replacement evaluating the metabolism is warranted.

Thus, our hypothesis was that wet distillers grains inclusion of 30 and 45% does not compromise the metabolism of beef cattle fed finishing diets and the objective of this study was to evaluate the effects of increasing levels of de-oiled WDG (0, 15, 30, and 45%; DM basis) on DMI, total tract digestibility of nutrients, feeding behavior, ruminal fermentation and microbial protein synthesis of feedlot Nellore cattle.

2. Materials and methods

2.1. Animals and feed management

This study was carried out at the Animal Unit of Digestive and Metabolic Studies from the Department of Animal Science at São Paulo State University (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil. The São Paulo State University Institutional Animal Care

and Use Committee approved all experimental protocols used in the current study (approval number: 00719711).

The WDG was obtained from the São Francisco Plant, located in Quirinópolis /GO, and it was compacted and storage on buckets with a capacity of 200L and sealed. The by-product was treated with inoculant composed of two species of bacteria: *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. (Feedtech™ silage F600, Delaval, Tumba, Sweden), with a concentration of 1 mg/kg of WDG, following the recommendations of the company. The chemical composition can be observed at table 1.

Table 1: Chemical composition of wet distillers grains (WDG)

Nutrients	%
DM	30.0
CP	32.7
EE	4.6
NDF	56.5
ADF	17.3
Ash	5.2

Legends: DM: Dry Matter; CP: crude protein; EE: ether extract; NDF: neutral detergent fiber; ADF: acid detergent fiber;

Eight ruminally-cannulated Nellore (BW =453±32 kg) were housed in individual concrete pens and distributed in four treatments were: T1: 0% (control); T2: 15%; T3: 30% and T4: 45% of WDG on dry matter (DM) basis used in a 4 × 4 replicated Latin square design. The trial consisted of four 28-d experimental periods, where each period consisted of 14 d of adaptation and 14 d of sampling collection. The feedlot diets were formulated to be isoenergetic, same levels of physically effective neutral detergent fiber and crescent levels of protein by LRNS (*Large Ruminant Nutrition System*; Fox et al. 2004), levels 2, presented a concentrate: forage ratio of 88:12 (Table 2).

Table 2: Experimental diets composition for finishing Nellore cattle.

Ingredients (% DM)	Treatments ¹			
	0	15	30	45
<i>Composition</i>				
<i>Tifton 85 Hay</i>	4.20	4.20	4.20	4.20
Sugarcane bagasse	7.10	7.10	7.10	7.10
Ground corn	74.92	65.27	52.00	38.73
Soybean meal	10.36	4.78	2.94	1.10
Wet Distillers Grains	0.00	15.00	30.00	45.00
Vitaminic-minerals supplement ²	3.42	3.42	3.42	3.42
Potassium chloride	0.00	0.23	0.34	0.45
<i>Nutritional values (%)</i>				
Dry matter (%DM)	65.36	64.89	57.31	48.48
Ether extract (%DM)	2.84	3.58	3.92	4.01
Crude Protein (%DM)	12.06	13.54	15.72	18.24
RDP(%CP) ³	64.50	40.80	38.01	27.71
RUP(%CP) ³	35.50	59.20	61.99	72.29
Non-fiber carbohydrates (%DM)	64.75	55.43	47.83	39.84
Neutral detergent fiber (%DM)	17.15	24.39	30.40	37.05
Fndf ⁴ (%DM)	9.00	9.00	9.00	9.00
Ca ⁵ (%DM)	0.74	0.72	0.72	0.72
P ⁶ (%DM)	0.36	0.41	0.48	0.55

¹ Inclusion levels of WDG, %

²Vitaminic-minerals supplement content ¹: 18.5% Ca; 1.9% S; 1.50% Mg; 4.3% Na; 1.60% P; 1714.00 ppm Zn; 1285 ppm Mn; 426.00 ppm Cu; 21 ppm I; 5.70 ppm Se; 8.5 ppm Co; 285.00 ppm I; 85700.00 UI Vit A; 11430.00 UI Vit D3; 128.00 UI Vit E; 32.5% Urea; 945.00 ppm of sodium monensin; ³ According to NRC (2001); ⁴forageNDF; ⁵Calcium; phosphorus⁶;

All the animals received ectoparasites, endoparasites infusions and were weighted at the beginning of the first period and were weighted in the end of each subsequent period.

The ingredients were weighed individually, and the diets of each treatment were mixed daily using a feed mixed and offered *ad libitum* as a total mixed ration (TMR) at

0800 and 1400h, which was 50% of total feeding at each time. Orts were collected and weights recorded at 0630 h and feeding rate was adjusted daily to yield orts of 10% of daily intake. Daily sample of sugarcane bagasse and weekly sample of WDG were analyzed for DM using *Koster moisture test* for to adjust the DM of the diets and DMI.

2.2. Collection period and experimental analyses

2.2.1 Evaluation of feeding behavior

At the first sampling day (15d), each animal was evaluated during 24h. The behavior was recorded every 5 min, and classified as time spent ruminating, resting, eating and other activities. Time and number of chewing per ruminal bolus were evaluated, according to Bürger et al. (2000).

2.2.2 Total digestibility

Samples of TMR, orts, total collection of feces and urine were collected during 5 days (17-22d), from each animal. The samples of TMR and orts were collected during the first feeding time and dried to 60°C for 48 h at forced air oven, and then pooled for each animal. The excreted feces were collected immediately after each spontaneous defecation, stored in 20 L plastic buckets, and at the end of 24-h collection, the feces were weighted, recorded and aliquots of 5% of the daily feces excretion were collected and dried in a forced-air oven at 60°C for 72 to 96h. Dried samples were ground through a 1-mm screen using a Wiley-type mill, and analyzed for nutrient composition (Tables 3)

The composite samples of TMR, orts and feces were used to determine DM (AOAC, 2005, method 934.01); OM (AOAC, 2005, method 442.05), EE (AOAC, 2005, method 920.85), CP was determined by Kjeldahl method procedures (AOAC, 2005 method 990.13), ash (AOAC, 1990, method 924.05) and NDF analyses were performed without sodium sulfite and with heat stable alpha amylase (Ankom Technology,

Macedon, NY); The data were corrected for residual ash and protein (Van Soest et al, 1991 and Sniffen et al., 1992) and NFC was calculated based upon nutrient percentages subtracted from 100% of feed DM by the equations: $NFC\% = 100\% - (CP\% + a,pNDF\% + EE\% + Ash\%)$ (NRC 2001).

The total tract digestibility was calculated by Cochran and Galyean, (1994), where:

Tract total digestibility = $[(\text{amount of offered nutrient} - \text{amount of nutrient on orts} - \text{amount of nutrient on feces}) / (\text{amount of offered nutrient} - \text{amount of nutrient on orts})] / 100$.

2.2.3 Microbial Protein Synthesis

During the total digestibility collection (17-22d), total urine sampling was performed using collector funnels that were equipped with polyethylene hoses attached into a bucket on the ground containing 200 mL of 20% (v/v) sulfuric acid to prevent loss of N (Chizzotti et al. 2007). After 24 h, the total volume of urine was recorded, mixed, filtered through a four layer of cheesecloth, stored in 40 mL aliquots with 10 mL H₂SO₄ solution 0.036 N and more 50 mL of pure urine in another container. These samples were kept at -20°C, and later used for determination of purine derivatives, namely allantoin and uric acid. Analysis of allantoin in the urine were performed at by the colourimetric method, according to Chen e Gomes (1992) and uric acid determination was performed using commercial kits (Labtest) according with Fujihara et al. (1987). Total excretion of purine derivatives was calculated based on the sum of the amounts of allantoin and uric acid excreted in urine, expressed in mmol/day. Absorbed microbial purines was calculated as: $PD = 0.85 \times Pabs + 0.385 \times LW^{0.75}$, in which 0.85

is the recovery of absorbed microbial purines in urine and $0.385 \times LW^{0.75}$ is the endogenous contribution in PD excretion (Verbic et al., 1990).

2.2.4 Ruminal fermentation

Ruminal content was collected manually, filtered through four layers of cheese cloth immediately before feeding (0h) and at 2, 4, 6, 8 and 10h post feeding on day 23 of the sampling week. Samples were later analyzed for ruminal ammonia nitrogen ($\text{NH}_3\text{-N}$), volatile fatty acids (VFA) and the pH (measured after the contents were filtered). 15 mL aliquots were stored at -20°C and were used to determine the $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration as describing by Fenner (1963), adapted for use in Kjeldahl distillation.

The VFA concentrations were analyzed using 1.6 mL of ruminal fluid added with 0.4 mL metaphosphoric acid:formic acid (3:1; 250 mL/L metaphosphoric acid:980–1000 mL/L formic acid) and 0.2 mL of 100 mM 2-ethyl-butyric acid (the internal standard). The homogenate was then centrifuged; 1.2 mL of the supernatant was transferred to a chromatography vial. The quantification of SCFA was performed using Agilent 7890A gas chromatograph equipped with flame ionization detector (7683B) and a fused-silica capillary column (J &W19091F-112, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), 25 m in length and 320 μm internal diameter, containing 0.20 M cyanopropyl polysiloxane. The data acquisition was performed using the ChemStation software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and hydrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL/min (Ferreira et al., 2015).

2.5 Statistics Analysis

All data were subjected to a completely randomized design using the PROC MIXED of SAS (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC) as a replicated 4×4 Latin square arrangement. The statistical model used was

$$Y_{ijklm} = \mu + D_i + LS_j + F_{k(j)} + P_l + \varepsilon_{ijklm},$$

where Y_{ijkl} = dependent variable; μ = overall mean; D_i = fixed effect of diets (0, 15, 30, or 45); LS_j = random effect of Latin square; $F_{k(j)}$ = random effect of animal within Latin square; P_l = random effect of period and ε_{ijklm} = random error. Linear, quadratic and cubic effects were assessed using orthogonal contrasts. Data from different time points (pH, VFA, and NH_3-N) were analyzed as repeated measurements in the experimental model First-order autoregressive was the covariate structure used for analysis because it resulted in the lowest Bayesian information criterion. Differences were declared when $P \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Total digestibility

Intake of DM, OM and EE decreased quadratically ($P < 0.05$) with WDG inclusion, where animals fed diet with 30% had the greatest value (8.77; 8.43; 0.373, respectively). Intake of CP increased linearly, calculated in 31.24% more, as the levels of WDG increased (L; $P < 0.01$). NDF intake had increased 54% more for animals fed 45% of WDG compared to control diet, (Q; $P < 0.05$), opposing at NFC intake, where animals fed control diet presented approximately 43% greater than animals fed 45% WDG.

Dry matter and organic matter digestibilities decreased quadratically ($P < 0.05$), with the greatest value for control diet and least levels for 15% of WDG. Crude Protein and NDF increased linearly, as the levels of WDG inclusion increased ($P < 0.05$); Whereas, NFC decreased linearly ($P = 0.02$). Cubic effect ($P = 0.004$) was observed for EE

digestibility with the greatest levels for diet at 15% of WDG, intermediate values for 30 and 45% (81.77 and 83.71) and the control diet presented the least levels (77.79%). (Table 3).

Table 3: Dry Matter, nutrients intake and digestibilities of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains.

Item ¹ (%)	Levels of WDG (%)					Contrast ³		
	0	15	30	45	SEM ²	L	Q	C
Intake (kg/DM)								
DM	8.01	8.75	8.77	7.92	0.572	0.841	0.016	0.902
OM	7.80	8.34	8.43	7.51	0.571	0.522	0.014	0.648
CP	0.99	1.17	1.38	1.44	0.105	<.001	0.268	0.478
NDF	1.18	1.95	2.42	2.62	0.185	<.001	0.008	0.942
EE	0.225	0.304	0.373	0.268	0.047	0.161	0.009	0.267
NFC	5.14	4.82	4.17	2.90	0.295	<.001	0.022	0.718
Digestibility. (%)								
DM	74.84	70.04	71.62	71.82	1.883	0.121	0.028	0.121
OM	76.51	72.98	73.21	73.73	1.948	0.121	0.086	0.496
CP	71.91	72.79	77.52	80.19	2.095	<.001	0.448	0.269
NDF	51.93	55.78	57.34	63.24	3.418	0.007	0.694	0.569
EE	77.79	86.38	81.77	83.71	2.533	0.042	0.023	0.004
NFC	83.25	80.85	80.19	79.12	1.954	0.020	0.576	0.693

Legends: ¹DM: Dry Matter; OM: Organic Matter; CP: crude protein; NDF: neutral detergent fiber; EE: ether extract; NFC: Non-fiber carbohydrate; ² Standart error means; ³ *P*-value for linear, quadratic, cubic contrasts

3.2 Feeding behavior

Results of feeding behavior are presented in Table 4. There was no difference for chewing per ruminal bolus, chewing time and other activities ($P > 0.05$). A similar pattern was observed for DMI and time spent ruminating, in which animals fed up to 30% of WDG presented the highest values and decreased with 45% of the by-product. Whereas,

time spent eating increased linearly ($P < 0.01$) according to increasing levels of WDG, hence, the time spent resting decreased linearly ($P = 0.003$).

Table 4: Feeding behavior variables of Nellore cattle fed with increasing levels of WDG.

Item	Levels of WDG (%)					Contrast ³		
	0	15	30	45	SEM ²	L	Q	C
DMI ¹ (kg DM)	7.83	8.75	8.93	7.38	0.760	0.479	0.003	0.549
Time spent eating. (min)	168.13	179.38	189.38	227.50	22.907	<.001	0.131	0.450
Time spent ruminanting. (min)	198.12	242.81	261.87	219.38	22.246	0.002	0.002	0.533
Time spent resting. (min)	966.87	913.12	896.25	894.37	31.206	0.003	0.114	0.758
Other activities. (min)	92.50	69.37	70.00	85.62	16.188	0.661	0.069	0.847
Time of chews per ruminal bolus (n)	46.47	43.50	46.47	45.61	3.531	0.975	0.717	0.453
Time of chews (sec)	56.72	53.00	54.35	57.43	4.348	0.827	0.345	0.833
Chews/time (n/sec)	0.82	0.83	0.86	0.79	0.040	0.508	0.121	0.215

¹Dry matter intake; ²Standart error of means; ³ P -value for linear, quadratic, cubic contrasts

3.2 Ruminal fermentation

There were observed time x treatment interaction for pH data and ammonia nitrogen concentration ($P < 0.03$, figure 1 and 2, respectively). For pH, control diet was consistently lower in all time points from time 2h comparing with other treatments. Whereas, $\text{NH}_3\text{-N}$ was higher for control diet between time point 0 to 4h and after, animals fed 45% of WDG presented the higher values; the majority of the time, the diet with 30% of WDG showed the lesser concentration. For total VFA concentration and molar proportions there is no interaction time x treatments ($P > 0.05$), thus, the average of the values are present in table 5.

Molar proportion of acetate and isovalerate were not affected by treatments ($P > 0.05$). However, molar proportion of propionate, butyrate and total VFA were linearly affected by treatments ($P < 0.01$), in which animals fed diets with 45% had the greatest values for propionate and least for butyrate and total VFA. Regarding branched-chain VFA (BCVFA), molar proportion of valerate increased quadratically ($P = 0.023$), with the highest levels being 45% and least 15%. Isobutyrate and acetate: propionate ratio (A:P) presented cubic responses ($P < 0.05$) with both 0% and 30% being the highest value, consequently 15% and 45% showed the least concentration.

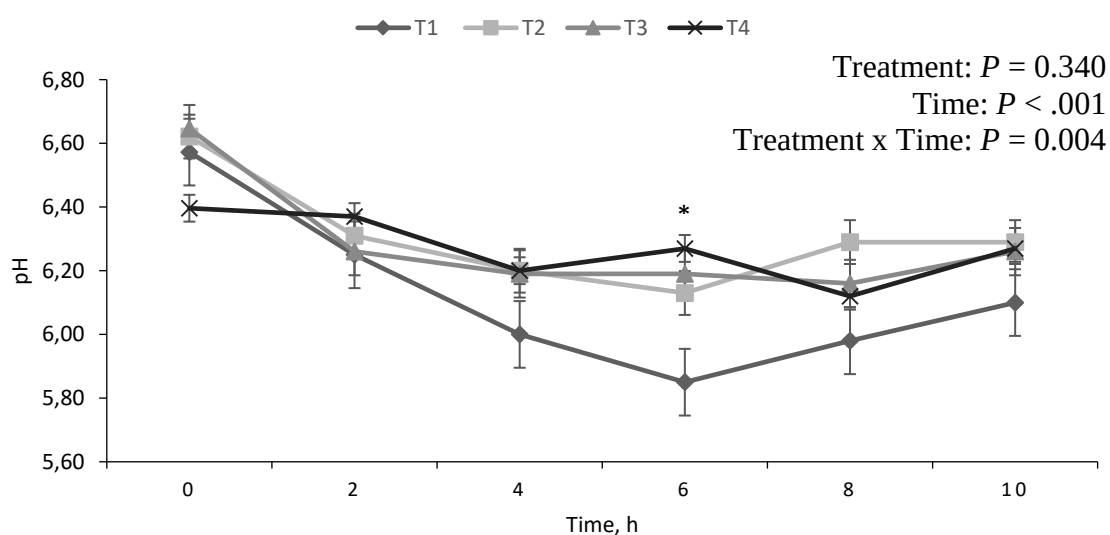


Figure 1: Dynamics of pH after morning feeding of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).

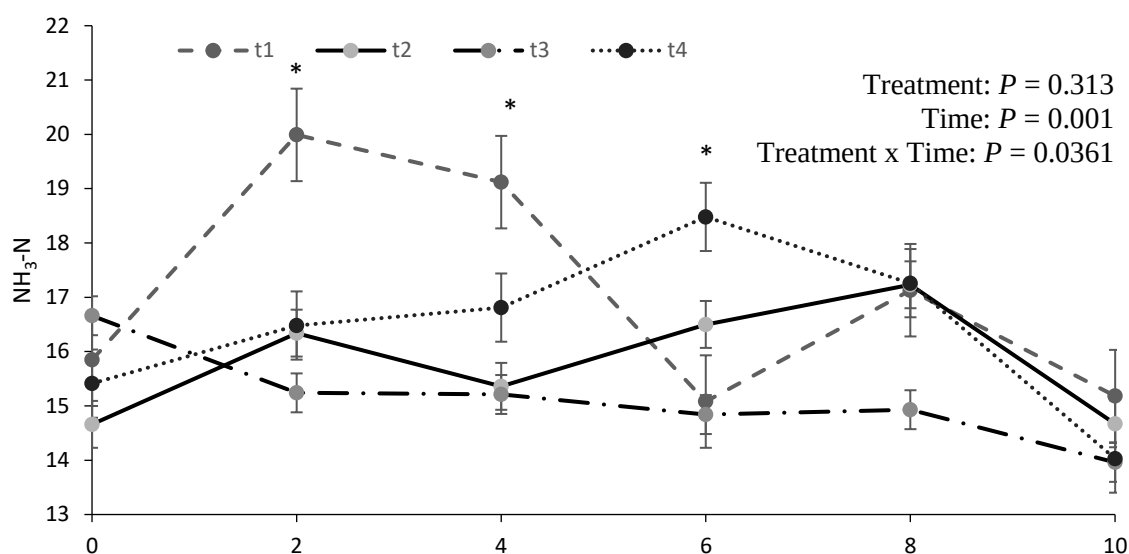


Figure 2: Dynamics of N-NH₃ after morning feeding of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).

Table 5: Volatile fatty acids concentration and molar proportion of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).

Item. (%)	Levels of WDG (%)				SEM ²	Contrast ³		
	0	15	30	45		L	Q	C
Acetate	60.83	60.72	62.48	62.13	1.144	0.122	0.881	0.276
Propionate	18.39	21.34	20.39	21.89	1.036	0.027	0.445	0.136
Butyrate	13.88	12.76	11.53	10.95	0.656	0.001	0.624	0.758
Valerate	1.17	1.12	1.15	1.32	0.032	0.032	0.023	0.668
Isovalerate	1.21	1.20	1.12	1.13	0.081	0.367	0.856	0.631
Isobutyrate	4.49	2.87	3.31	2.62	0.361	0.001	0.177	0.038
A:P ¹	3.34	2.81	3.18	2.92	0.232	0.177	0.338	0.019
Total (mmol/L)	91.05	84.87	71.07	79.01	8.510	0.027	0.160	0.194

¹Acetate: Propionate ratio; ²Standart error means; ³ P-value for Linear; Quadratic; Cubic contrast

3.3 Microbial protein synthesis

Microbial protein synthesis was analyzed by purine derivatives and the data is shown in Table 6. The efficiency of microbial synthesis had a cubic response with control

diet and 30% of WDG presenting the highest values, than 15% and 45% of WDG, showed the lowest values ($P = 0.032$)

The relation of N_{mic}/N_{intake} (g/g) decreased linearly, as the inclusion of WDG increased ($P=0.016$).

Table 6: Microbial protein synthesis variables of Nellore cattle fed increasing levels of wet distillers grains (WDG).

Item	Levels of WDG (%)					Contrast (p value) ⁴		
	0	15	30	45	SEM ³	L	Q	C
Volume (L)	7.65	7.67	8.43	8.67	1.034	0.081	0.821	0.547
Uric acid (mmol/d)	7.62	9.11	9.04	8.07	1.495	0.653	0.084	0.836
Allantoin (mmol/d)	131.45	120.48	127.48	106.85	21.500	0.496	0.815	0.622
Purine derivative (mmol/d)	139.00	129.60	138.68	114.95	21.898	0.518	0.737	0.588
N_{mic} ¹ (g/d)	84.28	76.37	83.92	63.83	18.674	0.520	0.740	0.595
Efficiency ² (g/kg)	113.85	78.57	81.73	45.69	21.302	0.022	0.982	0.032
N_{mic}/N intake (g/g)	0.68	0.40	0.35	0.16	0.011	0.016	0.617	0.343

³Microbial nitrogen; ²Microbial protein synthesis/organic matter digestible; ³Standart error means; ⁴ P Values for Linear; Quadratic, Cubic contrasts.

4. Discussion

The DMI and OMI of Taurine beef cattle fed distillers grains has been very well documented in the literature (Klopfenstein et al., 2008; Corrigan et al., 2007; Luebbe et al., 2012). The similar behavior was observed with Nellore cattle, being a quadratic response for both variables ($P = 0.016$ and 0.014), where cattle increasing the DMI up to 30% of WDG and decreasing with 45% (Table 4).

Luebbe et al. (2012), evaluating increasing levels of WDGS (0, 15, 30, 45 and 60%) in replacement of corn, observed a quadratic response ($P < 0.01$) for DMI with

increasing the levels of the by-product, being the greater values for 15% and 30% of WDGs. Thenkle (1997), replacing 40% of WDG decreased 10% of DMI without affected the cattle performance. The similar pattern was observed in the present study, where animals fed 45% of WDG presented 9.75% less DMI in comparison with animals fed 30% of WDG. Therefore, nine studies utilized for a meta-analysis by Vander Pol et al. (2009) including 34 treatments and 1257 steers were conducted in the same feedlot cattle under similar conditions, evaluating levels of WDG between 5.2 to 50% replacing corn-based diets using DRC and High Moisture Corn (HMC). The most common levels were among 30 and 40%. Similar to the present study, all of the experiments had a quadratic response for average day gain (ADG) and DMI ($P < 0.01$), both maximized at 30% of DG inclusion.

Luebke et al. (2012), reported that increasing levels of WDG at the diet the concentration fat had increasing (6.64 to 8.25%), justifying the depression of the DMI. It is known that indicated levels of fat for cattle diet is up to 7% (NRC, 2001). Depenbush et al (2009) observed reduction of DMI in 5.7% when the dietetic fat concentration increase of 7.1% to 8%. Demonstrating that this quadratic responses in DMI commonly observed in experiments that fed increasing levels of WDG is associated with excessive dietary EE.

However, we expected to formulate the diets to contain high concentrations of EE as normally is found, but the EE content of the DG used in this trial was somewhat less than expected (Tables 1 and 2) being considered de-oiled or low-fat WDG (4,6% of EE). Nevertheless, even though the WDG used in the present study was low in fat and sulfur, animals fed diets with 45% of WDG decreased DMI and DMO (Table 3; $P < 0.05$).

Our possible explication the decrease in DMI at 45% levels of WDG, beyond the higher intake of fiber, may be due that, the dietetic DM presented among 46% and 51%,

that is, increased the amount of offered natural dry matter, limited physically the intake through the filling and distension of the gastrointestinal tract. Regardless that, Allen et al. (2009) suggested that, propionate is likely a primary satiety signal affected by hepatic oxidation via conversion to acetyl-CoA and generation of ATP. Likewise, the author cited that amino acids (AA) are extensively metabolized in the ruminant liver, especially with excess dietary protein intake and subsequent greater ammonia absorption. Thus, according to the records of present study, the molar proportion of propionate increase linearly, as long as the level of WDG increased, ($P=0.027$) and the WDG is a greater source to metabolized protein, achieving 22% of the dietetic CP with 45% of the by product, supplying higher AA concentration.

In relation to control diet, the likely reason for the less intake certainly is derived to high dietetic starch concentration composed to 74% (table 2). The fermentable- diet reduced the pH and can clearly influence DMI of feedlot cattle and increasing the risks to metabolic disturbers as sub-acute acidosis. Adding DG especially at levels above 20% of DM may help to prevent some problems, because the starch is removed during the process of DG, but fiber, protein, and fat are increased (Klopfenstein et al. 2008).

A meta-analysis performed by Bremer et al. (2011) observed that DMI increased up to 30% of full-fat DG and was attributed to greater NDF and low starch concentration of the by-product. For digestibilities, Corrigan et al. (2009) found reduction in total tract DM digestibility compared with corn-based control diets. May et al. (2008), also related reduction in MO digestibility in animals fed 25% of DDGS in corn-based diet and steam flaked corn (SFC). Luebbe et al (2012), found both MO e MS reduction for total tract digestibility as long as the level of WDG increased, also justifying though the increase of NDF intake, the average of MO digestibility was very similar to this present study (76% vs 74,10%, respectively), as well as Corrigan (2019) with 78%.

The NDF intake increased linearly ($P>0.01$) with the levels of distillers has increased, reflecting the difference between the NDF concentration from WDG (56%) and starch (11%). Hence, the NDF digestibility had increase linearly, according with Vander Pol et al (2009), using 40% of WDG in the diet compared with based-corn diet showed higher digestibility of NDF in cattle fed the by product. Luebbe et al. (2012), suggested that the greater digestibility of WDG, is because the dilution effects, where, as long as the level of WDG increasing, the amount of starch decrease, which is favors to NDF digestion. The DG content is rich in NDF, but small quantity of lignin, reflecting in higher digestible fiber (62 to 71%) (Birkelo et al., 2005 and Vander Pol, 2009). Our results of NDF digestibility agree with the literature, varying 51% to 63%. Corrigan et al (2009) noted that, in situ NDF degradability of 40% WDG in the diet was higher than corn-based diet. Penner et al (2009), replaced barley silage per WDG for lactating cows, suggests that WDG could potentially be used as a partial forage, where aNDF concentration for WDG (56.48%) was higher than barley silage (45.57%). In addition, milk yield increased by 3.5kg/d for cows fed WDG compared to cows fed control ($P<0.01$), milk fat yield was not affected but milk CP yield was increased by 0.12kg/d for cows fed WDG over the control ($P<0.01$), without affecting DMI. However, the literature is not consistent and Corrigan et al (2009), May (2009) and Uwituze et al (2010), reported no differences for NDF digestibility when WDG was fed.

The NFC intake decreased 43% comparing 0% *versus* 45% WDG-diets. (5.14 to 2.90 kg/MS per day), hence, the NFC digestibility showed the linearly reduction ($P=0.020$) as long as the levels of WDG increased. However, it is unclear, why decreasing the starch intake and digestibility and increased the molar proportion of propionate. Luebbe et al (2012), Vander Pol et al (2009) e Uwituze et al (2010), observed reduction of starch digestibility on the total tract digestibility of cattle fed WDG and DDG ($P <$

0.05). However, May et al (2009, 2010) and Corrigan et al (2009), did not find statistics differences for starch digestibility in corn-based diets with DGS. In study of Foth et al. (2014), evaluating 30% of low-fat DDGS as replacement of corn, reported digestibility where, OM and DM had decreased ($P < 0.01$), NDF and EE had increased and did not observed changes for NFC and starch. ($P=0.29$ and 0.59 , respectively). In addition, estimating energy intake, the author found higher intake of crude energy in diets where animals consumed the by-product-diet compared to corn-based diet (88.1 mcal/day vs 84.3; $P<0.04$). Also, the net-energy lactation has increasing of 1,43 to 1,47 Mcal/kg of DM, even with the reduction of NFC (42,3 to 35,5% DM), suggesting that is plausible that increasing the EE, NDF and CP intake, may be contributing to energy requirements, reverting to higher milk production (30,9 vs 29,8 kg/day).

Anderson et al. (2015), supplementing heifers with low-fat DDGS (EE = 3.08%) and High fat (EE = 7.01%) compared to control diet (EE = 2.91%), reported lower NFC, starch digestibility and higher EE digestibility in by-products-based diet, confirm that up to 8% of EE in the diet did not affect the performance. In the present study, the dietetic EE was crescent, as long as the level of WDG had increased, but the EE intake showed the quadratic response ($P = 0.009$), as DMI, with 15 and 30% WDG presenting the great values, and dropped for 45% WDG (quadratic, $P = 0.023$). Thus, we observed that, the higher EE intake showed the lower digestibility, for animals fed 30% WDG, but, when the EE intake decreased for animals fed 45% WDG, the digestibility improve compared with animals fed 30% of by product. Anyway, both intake and digestibility was greater for animals fed DG compared with control diet.

Manthey et al. (2016) supplying 30,40 or 50% of DDGS for growing grazing heifers, presented diets with 3.06; 3.74 and 4.41% of EE and observed that, up to 50% of DDGS did not affect the performance, improve feed efficiency [Gain:Feed (G:F)], and

increase propionate concentration (18.1; 19.1 and 22.6 Mm, respectively, $P > 0.01$), probably due to changes in the microbial populations, privileging the amilolytics bacteria and increase of ruminal fermentation.

In relation to ruminal fermentation, the molar proportion of butyrate, as such as total VFA concentration, showed linearly decreased as long as WDG increased ($P < 0.05$). Moreover, the propionate increase linearly ($P=0.02$) and A: P ratio noted the cubic response, with the higher levels being the 0% and 30% of WDG ($P=0.01$). Lastly concentration of acetate did not change ($P > 0.05$). Vander Pol et al (2009) and Leupp et al (2015) also indicated higher levels of propionate concentration and decreased of A:P in steers fed WDGS compared with control-corn diet; But in both studies decreased the acetate concentration. Lana et al (1998) and Coe et al (1999), observed a tendency to decrease the A:P similar with this present study, probably because the higher propionate production for WDG-diets.

Our hypothesis for the increase propionate with highest levels of WDG for finishing cattle, agree with May et al. (2014), where studying SFC or DRC with 0% or 25% DDGS, found higher concentration of lactate production in cattle fed 25% of DDGS (0.48 mM vs 0.95 Mm, $P < 0.05$, respectively) and explained that, could happens some incomplete fermentation of carbohydrates during the ethanol production and results in residual sugars within the by-products, thus may providing substrate for the production of lactate into the rumen. It is known that mono- or disaccharides could be readily converted to lactate by ruminal microorganisms, occurring a proliferation of lactate-utilizing bacteria, as the case of *Megasphaera Elsdenii*.

Megasphaera Elsdenii is a gram-positive coccus, and is considered one of the main lactate-utilizing bacterium, which is principally converted to propionate and acetate in the rumen (Marounnek et al, 1989), and yet use glucose and maltose and competes with

lactate producers for substrate. Kung and Hessian (1995) found that, microbial population of this bacteria avoid accumulation of lactic acid when animals are challenged with highly fermentable carbohydrates diets, being important to prevent acidosis as well, maintaining pH above sub-acute ruminal acidosis (SARA) levels ($\text{pH} < 5.6$), (Owens et al., 1998; Nagaraja and Titgemeyer, 2007). This is possible to see in this study where, WDG-treatments remained the pH over the SARA-levels, characterizing an adequate environment for proliferation of this bacterium.

In study by Fron et al (1995), were conducted a trial to determine the impact of distiller's by-product on microbiology and metabolism of cannulated steers fed DRC-control diet or placed a DRC with condensed distillers solubles (CDS) at 15% of DM and reported an increase in amylolytic (starch-degrading) and lactate-utilizing bacteria in steers fed distillers by-product. The in vitro trial, the capacity of the rumen microbes to ferment lactate was increased around two-fold ($P < 0.07$) in condensed distillers diet. Those results showed that distiller's by-products favors microbial population to utilize lactic acid, being able to produce propionate. However, these analyzes were not performed in the present experiment.

Therefore, the isoacids are supplied thought bacterial that is able to degraded AA, as *saccharolyticas*, and assuming the concentrations of AA into the rumen can become a limiting factor for maximal bacterial growth on rumen undegradable protein (RUP), our results are according with the literature, where the molar proportion of isovalerate and isobutyrate was higher for the control diet ($P < 0.01$), however, the molar proportion of valerate seemed higher concentrations for control diet and 45% of WDG-diet though. Hemsley and Moir (1963), reported an increased total VFA concentration when a mixture of isobutyric, isovaleric and valeric was added to a diet, indicating a greater microbial fermentation rate, consequently isoacids have a general positive influence on bacterial

growth and microbial protein synthesis (Russel and Sniffen (1984). However, further investigation is necessary to better understand the value of isoacids for cattle but, in general, ruminal deficiency of isoacids does not seem to be a limiting factor. (Andries et al.,1987).

Total VFA decreased linearly as long as the level of WDG increased ($P = 0.027$), contradicting to Ham et al. (1994), fed steers with 40% of WDGS as replacement DRC with 90:10 the concentrate: forage ratio and did not related the statistics differences in total VFA and pH, compared with corn-based diet. In addition, Peter et al. (2000), including 20% of DDGS, as replacement to corn in finishing diet, also did not find effects in the total VFA concentration.

There was an interaction observed for average pH ($P < 0.05$), where in time-point 6h, the control diet showed the lower value than the WDG-diets; In general the average pH was 6.13 for the control versus 6.29 for WDG-diets; However, previous researches did not find any differences in average ruminal pH between WDGS and corn-based finishing diet. (Ham et al, 1994; Corrigan et al, 2009; Vander Pol et al., 2009).

Jolly-Breithaupt et al (2018), when comparing five treatments for steers (corn-based control, WDGS, CDS with or without oil), no interactions and no differences were noted for the minimum pH, maximum pH, pH magnitude and variance ($P > 0.19$). However, Pesta et al (2015) found average ruminal pH to increase in steers fed WDGS compared with CDS or corn-based control.

Benchaa et al (2012) testing DDGS for lactating Holstein cows, noted a tendency ($p=0.06$) for increase the minimum pH as long as the dietary-DDGS increased, and the plausible explanation is the reduction starch and increase NDF concentration. It is known that, ruminal degradation of NDF is slower than starch, which causes less accumulation of VFA and less ruminal pH fluctuation after feeding. It is very consistent in the literature,

where, low pH decreases fiber degradation in both in vivo and in vitro studies (Grant and Weidner, 1992; Mourino et al., 2001). The pH variation affect lag time and/or fiber degradation; In addition, when pH is lower than 6.0, the growth of fiber-degrading bacteria tended to be impaired (Sung et al., 2007).

The higher pH in WDG-diets could be related to decrease the NFC intake as long as the WDG increased, and linearly increased intake and digestibility of NDF; However, is very important to provide a synchronization between intake of nutrients for optimize adequate environmental conditions for fermentation, degradation and supply microbial protein synthesis, providing AA to be absorbed by ruminants.

In the present experiment, the microbial protein synthesis was determined thought purine derivative (PD) in the total urine excretion and we observed similar results with the literature. According Fregadolli et al (2001), when the utilization of carbohydrates is scarce, could occur reduction in DMI and the nitrogen is released as ammonia. The decreased of microbial synthesis efficiency per organic matter digestible and the Nmicrobial:Nintake ratio, probably happens due the lower NFC intake, resulting in one lack of synchronism between protein and energy carry out to higher concentrations of ammonia-nitrogen in the animals fed 45% of WDG; Hence, there is an interaction ($P = 0.03$) for time x treatments for ammonia-nitrogen concentration, where the higher levels occurred in animals fed 0 or 45% levels of WDG.

Dewhurst et al (2000) reported that sometimes, the synthesis of microbial protein is increased by the inclusion of moderates quantities of carbohydrates readily fermentable in the diet, because there is a substrate available for growth of bacteria associated with the liquid phase of digestion. Supplying balanced fiber and energy rations is important and could improve the efficiency of this synthesis due to improvement of the ruminal conditions by rumination and salivation processes, although higher inclusions of starch

may affect the microbial synthesis, because the quickly fermentation and decrease of ruminal pH, impaired fiber degradation, increase energy losses and declines the amino acids synthesis *de novo* (Russell and Wallace 1997).

The nitrogen available was not negatively affected by WDG treatments, because there is an increase on digestibility and intake of crude protein ($P < 0.05$) (Table 3). Russell et al (1992), reported that either the degradation rate of protein exceed the rate of carbohydrates, greater amount of nitrogen could be lost as ammonia form or the degradation rate of carbohydrates was least than protein, occurred the reduction in microbial growth; Both the factors could be used for the explanation to decrease the microbial protein synthesis as long the WDG-diets increased in this experiment.

Kelzer et al (2011) did not observe differences on performance of steers when 35% of DDG or low-fat DDG was replaced 35% of corn-based diets. The author concluding that, the inclusion of distillers grains resulting in lower concentration of ammonia-nitrogen and increase the VFA compared with traditional DDG, which is consequentially of enhance microbial growth in the rumen. Ham et al (1994), reported reductions of ammonia-nitrogen concentrations when DGS-diets fed steers, even touch the CP quantity, mostly because the greater part is RUP ($> 70\%$), which is, the available of nitrogen into the rumen is decreased. Nichols (1998) and Anderson (2006) corroborate with this explanation for dairy cows.

The RUP and N concentration could be varying according with the ethanol plants. Leupp (2014) and Luebke (2012) did not find differences for ammonia-nitrogen concentrations with DDG-diets and similars values was found in the study by Castillo-Lopes et al (2014) evaluating increasing levels (0-30%) of reduced-fat distillers grains (4.0% of EE) present the concentration of ammonia-nitrogen varying in 17.62-19.25 mg/dl. Manthey et al (2016), using 30, 40 or 50% of DDGS for growth heifers found 15,4;

17,1; and 19,3 mg/dl of N-NH₃, indicating crescents linear effects for WDG-levels, justifying though decrease of starch and increase of protein-dietetic among the treatments.

When DG is included and provides MP greater than requirements of the animal, protein in DGS can be utilized as an energy source, improve AGC and G:F (Firkins et al 1985, Ham et al 1994). Oglesbee et al. (2016) suggest that protein within DGS is a significant portion of feeding values of this by product overall. Feeding values is calculated using the feed efficiency of DG diet relative to the control diet, and divided by WDGS inclusion. Conroy et al. (2016) isolated protein, fiber, and CDS from DGS. The feeding values for WDGS, protein, fiber, and CDS were 136%, 118%, 96%, and 82%, respectively, relative to corn, concluding that protein and fat from DGS are the majority of the feeding value of DGS.

The protein in DG is composed by yeast cells and have been heated during distillation and concentration process from wet milling industry. Bruning and Yokoyama (1988) showed that heat denatured yeast rendering them resistant to lyses and microbial degradation. Castillo-Lopes et al (2012) determined an average of 63% on rumen undegradable protein (RUP) of DDGS using in vitro evaluation, less compared with NRC (2001) reported 70.3%, similar with our results.

Furthermore, Silva et al (2018) evaluated the influence of increasing dietary RUP (38, 44, 51 and 57% of dietetic CP) in Holstein heifers using by-pass soybean meal, reported that efficiency of microbial protein synthesis, and the efficiency use of N for microbial protein synthesis were affected ($P < 0.05$), where the higher levels of RUP had lower values compared with the other treatments, similar with our outcomes, as well as, the CP digestibility varying 71-73%. Additionally, MP flow was affected by treatments ($p < 0.02$), and greater values were observed for treatments with 51% of RUP, which is

contributed by animals that present greater ADG, G:F, N retention, and numerically DMI and ME intake, likely increases AA flow to small intestine.

Penner et al (2009), observed increased of milk production in Holstein cows, suggesting the inclusion of WDG replaced barley, could increase the metabolize protein flow to small intestine, probably due to increase of protein digestibility of CP and quick rate passage. Anderson (2006) also related increasing in milk CP yield in WDG-diets, but in this case, replaced the concentrate fraction in the diet. Leupp (2014) reported increase of linear total tract digestibility supplying steers up to 60% DDGS and Li et al (2014), presented CP intake as digestibility greater in heifers fed DDG-diets.

5. Conclusion

In agreement with our hypothesis, the increasing levels of wet distillers grains could be used as replacement of soybean meal and ground corn for Nellore finishing cattle without compromising the metabolism; However, it was not possible to indicate the best level of inclusion on the diet with the analyses performed. Thus, further investigations are warranted.

6. References

Allen, M.S., Bradford, B.J., Oba, M., 2009. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim. Sci.* 87, 3317–3334. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1779>

Anderson, J.L., Kalscheur, K.F., Garcia, A.D., Schingoethe, D.J., 2015. Feeding fat from distillers dried grains with solubles to dairy heifers: I. Effects on growth performance and total-tract digestibility of nutrients. *J. Dairy Sci.* 98, 5699–5708. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9162>

Andries, J. I., Buysse, F. X., De Brabander, D. L., & Cottyn, B. G. (1987). Isoacids in ruminant nutrition: Their role in ruminal and intermediary metabolism and possible influences on performances — A review. *Ani. Feed Sci. and Tech.*, 3, 169–180. [doi:10.1016/0377-8401\(87\)90069-1](https://doi.org/10.1016/0377-8401(87)90069-1)

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official methods of analysis. 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

Benchaar, C., Hassanat, F., Gervais, R., Chouinard, P.Y., Julien, C., Petit, H.V., Massé, D.I., 2013. Effects of increasing amounts of corn dried distillers grains with solubles in dairy cow diets on methane production, ruminal fermentation, digestion, N balance, and milk production. *J. Dairy Sci.* 96, 2413–2427. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6037>

Birkelo, C.P., Brouk, M.J., Schingoethe, D.J., 2010. The Energy Content of Wet Corn Distillers Grains for Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 87, 1815–1819. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(04\)73338-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(04)73338-x)

Bremer, V.R., Watson, A.K., Liska, A.J., Erickson, G.E., Cassman, K.G., Hanford, K.J., Klopfenstein, T.J., 2016. Effect of distillers grains moisture and inclusion level in livestock diets on greenhouse gas emissions in the corn-ethanol-livestock life cycle¹. *Prof. Anim. Sci.* 27, 449–455. [https://doi.org/10.15232/s1080-7446\(15\)30517-9](https://doi.org/10.15232/s1080-7446(15)30517-9)

Burger, P. J., Pereira, J. C., Queiroz, A. C., Coelho S., José F., Valadares F., Sebastião C., Cecon, P. R., and Casali, A. D. P. 2000. Ingestive Behavior in Holstein Calves Fed Diets with Different Concentrate Levels. *Rev. Bras. Zootec.* 1, 236–242. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982000000100031>

Bruning, C. L. Yokoyama, M. T., 1988. Characteristics of Live and Killed Brewer's Yeast Slurries and Intoxication by Intraruminal Administration to Cattle, *J. Anim. Sci.*, 2, 585–591, <https://doi.org/10.2527/jas1988.662585x>

Castillo-Lopez, E., Klopfenstein, T.J., Fernando, S.C., Kononoff, P.J., 2013. In vivo determination of rumen undegradable protein of dried distillers grains with solubles and evaluation of duodenal microbial crude protein flow. J. Anim. Sci. 91, 924–934. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5323>

Castillo-Lopez, E., Ramirez Ramirez, H.A., Klopfenstein, T.J., Hostetler, D., Karges, K., Fernando, S.C., Kononoff, P.J., 2014. Ration formulations containing reduced-fat dried distillers grains with solubles and their effect on lactation performance, rumen fermentation, and intestinal flow of microbial nitrogen in Holstein cows. J. Dairy Sci. 97, 1578–1593. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6865>

Chen, X., Gomes, M., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of the technical details. Int. Feed Resour. Unit Occasional Publication. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.03.003>

Chizzotti, M. L., Valadares Filho, S. de C., Valadares, R. F. D., Chizzotti, F. H. M., Marcondes, M. I., and Fonseca, M. A. 2007. Intake, digestibility and urinary excretion of urea and purine derivatives in heifers with different body weights. Rev. Bras. Zootec.1, 138-146. <https://doi:10.1590/s1516-35982007000100017>

Cochran, R. C., M. L. Galyean 1994. Measurement of in vivo Forage Digestion by Ruminants. In: G. C. Fahey, editor, Forage Quality, Evaluation, and Utilization, ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI. p. 613-643. <https://doi.org/10.2134/1994.foragequality.c15>

Coe, M. L., T. G. Nagaraja, Y. D. Sun, N. Wallace, E. G. Towne, K. K. Kemp, and J. P. Hutcheson. 1999. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. J. Anim. Sci. 77:2259–2268. <https://doi.org/10.2527/1999.7782259x>

Conroy, B. B., M. K. Luebbe, G. E. Erickson, J. C. MacDonald, and J. A. Hansen. 2016. Impact of feeding distillers grains or isolated components in distillers grains on feedlot performance and carcass traits. Neb. Beef Cattle Rep. 122-123. <http://digitalcommons.unl.edu/animalscinbcr/870>

Corrigan, M.E., Erickson, G.E., Klopfenstein, T.J., Luebbe, M.K., Vander Pol, K.J., Meyer, N.F., Buckner, C.D., Vanness, S.J., Hanford, K.J., 2009. Effect of corn processing method and corn wet distillers grains plus solubles inclusion level in finishing steers. J. Anim. Sci. 87, 3351–3362. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1836>

Corrigan, M.E., Klopfenstein, T.J., Erickson, G.E., Meyer, N.F., vander Pol, K.J., Greenquist, M.A., Luebbe, M.K., Karges, K.K., Gibson, M.L., 2009. Effects of level of condensed distillers solubles in corn dried distillers grains on intake, daily body weight gain, and digestibility in growing steers fed forage diets. J. Anim. Sci. 87, 4073–4081. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-1969>

Depenbusch, B. E., C. M. Coleman, J. J. Higgins, and J. S. Drouillard. 2009. Effects of increasing levels of dried corn distillers grains with solubles on growth performance, carcass characteristics, and meat quality of yearling heifers. J. Anim. Sci. 87:2653–2663. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1496>

Dewhurst, R.J., Davies, D.R., Merry, R.J., 2000. Microbial protein supply from the rumen. Anim. Feed Sci. Technol. 85, 1–21. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(00\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(00)00139-5)

Fenner, H. and Elliot, J.M., 1963. Quantitative Method for Determining the Steam Volatile Fatty Acids in Rumen Fluid by Gas Chromatography. J. Animal Sci., 22: 624. <https://doi.org/10.2527/jas1963.223624x>

Ferreira, E.M., Pires, A.V., Susin, I., Biehl, M.V., Gentil, R.S., Parente, M.O.M., Polizel, D.M., Ribeiro, C.V.D.M., de Almeida, E. 2015. Nutrient digestibility and ruminal

fatty acid metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend, Anim. Feed Sci. Technol. 216, 30-39
<http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.007>

Firkins, J. L., L. L. Berger, and G. C. Fahey, Jr. 1985. Evaluation of wet and dry distillers grains and wet and dry corn gluten feeds for ruminants. J. Anim. Sci. 60:847-860. <https://doi.org/10.2527/jas1985.603847x>

Foth, A.J., Brown-Brandl, T., Hanford, K.J., Miller, P.S., Garcia Gomez, G., Kononoff, P.J., 2015. Energy content of reduced-fat dried distillers grains with solubles for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 98, 7142–7152. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-9226>

Fregadolli, F.L., Zeoula, L.M., Prado, I.N. do, Branco, A.F., Caldas Neto, S.F., Kassies, M.P., Dalponte, A.O., 2005. Effect of Starch and Nitrogen Sources of Different Ruminal Degradability. 1. Total and Partial Digestibility. Rev. Bras. Zootec. 30, 858–869. <https://doi.org/10.1590/s1516-35982001000300035>

Fron, M., Madeira, H., Richards, C., Morrison, M., 1996. The impact of feeding condensed distillers byproducts on rumen microbiology and metabolism. Anim. Feed Sci. Technol. 61, 235–245. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(95\)00943-4](https://doi.org/10.1016/0377-8401(95)00943-4)

Fujiyama, T.; Aerskov, E.R.; Reeds, P.J. 1987. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. J. Agri. Sci, 1, 7-12. <https://doi.org/10.1017/S0021859600080916>

Grant, R.J. and Weidner, S.J. 1992. Digestion Kinetics of Fiber: Influence of In Vitro Buffer pH Varied Within Observed Physiological Range¹. J. Dairy Sci. 75, 1060–1068. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(92\)77850-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(92)77850-3)

Hall, M.B., Eastridge, M.L., 2014. Carbohydrate and fat: Considerations for energy and more. *Prof. Anim. Sci.* 30, 140–149. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30101-7](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30101-7)

Ham, G.A., Stock, R.A., Klopfenstein, T.J., Larson, E.M., Shain, D.H., Huffman, R.P., 1994. Wet corn distillers byproducts compared with dried corn distillers grains with solubles as a source of protein and energy for ruminants. *J. Anim. Sci.* 72, 3246–3257. <https://doi.org/10.2527/1994.72123246x>

Hemsley, J.A. and Moir, R.J., 1963. The influence of higher volatile fatty acids on the intake of urea-supplemented low quality cereal hay by sheep. *Aust. J. Agric. Res.*, 14: 509-517. <https://doi.org/10.1071/AR9630509>

Jolly-Breithaupt, M.L., Nuttelman, B.L., Schneider, C.J., Burken, D.B., Gramkow, J.L., Shreck, A.L., Macdonald, J.C., Klopfenstein, T.J., Erickson, G.E., 2018. Finishing performance and diet digestibility for feedlot steers fed corn distillers grains plus solubles and distillers solubles with and without oil extraction. *J. Anim. Sci.* 96, 1996–2011. <https://doi.org/10.1093/jas/sky061>

Kelzer, M. ; Popowski, J. M. ; Bird, S. ; Cox, R. B. ; Crawford, G. I. ; DiCostanzo, A., 2011. Effects of including low fat, high protein dried distillers grains in finishing diets on feedlot performance and carcass characteristics of beef steers. University of Minnesota Beef Report Publication BR-1104 <https://www.auri.org/assets/2013/07/AIC-125.7.13.LFDDGS.pdf>

Klopfenstein, T. J., G. E. Erickson, and V. R. Bremer. 2008. Board-invited review: use of distillers by-products in the beef cattle feeding industry. *J. Anim. Sci.* 86:1223–1231. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0550>

Kung, L., Hession, J. R. and Hession, A. O., 1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. J. Anim. Sci. 1995. 73:250-256. <https://doi.org/10.2527/1995.731250x>

Lana, R.P., Russell, J.B., Van Amburg, M.E., 1998. The role of pH in regulating ruminal growth in the rumen. J. Anim. Sci. 76, 2190–2196. <http://doi.org/10.2527/1998.7682190x>

Leupp, J.L., Lardy, G.P., Karges, K.K., Gibson, M.L., Caton, J.S., 2009. Effects of increasing levels of corn distillers dried grains with solubles to steers offered moderate-quality forage. J. Anim. Sci. 87, 4064–4072. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1711>

Li, Y.L., Mcallister, T.A., Beauchemin, K.A., He, M.L., Mckinnon, J.J., Yang, W.Z., 2011. Substitution of wheat dried distillers grains with solubles for barley grain or barley silage in feedlot cattle diets: Intake, digestibility, and ruminal fermentation. J. Anim. Sci. 89, 2491–2501. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3418>

Luebke, M.K., Patterson, J.M., Jenkins, K.H., Buttrey, E.K., Davis, T.C., Clark, B.E., McCollum, I.T., Cole, N.A., MacDonald, J.C., 2012. Wet distillers grains plus solubles concentration in steam-flaked-corn-based diets: Effects on feedlot cattle performance, carcass characteristics, nutrient digestibility, and ruminal fermentation characteristics. J. Anim. Sci. 90, 1589–1602. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4567>

Manthey, A.K., Anderson, J.L., Perry, G.A., 2016. Feeding distillers dried grains in replacement of forage in limit-fed dairy heifer rations: Effects on growth performance, rumen fermentation, and total-tract digestibility of nutrients. J. Dairy Sci. 99, 7206–7215. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10785>

Marounek, M., Fliegrova, K. & Bartos, S., 1989. Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. Appl. Environ. Microbiol. 55:1570. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2764566>

May, M.L., Quinn, M.J., Reinhardt, C.D., Murray, L., Gibson, M.L., Karges, K.K., Drouillard, J.S., 2009. Effects of dry-rolled or steam-flaked corn finishing diets with or without twenty-five percent dried distillers grains on ruminal fermentation and apparent total tract digestion. *J. Anim. Sci.* 87, 3630–3638. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-0857>

Mouriño, F., Akkarawongsa, R., Weimer, P.J., 2010. Initial pH as a Determinant of Cellulose Digestion Rate by Mixed Ruminal Microorganisms In Vitro. *J. Dairy Sci.* 84, 848–859. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(01\)74543-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(01)74543-2)

Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., 2010. Ruminal Acidosis in Beef Cattle: The Current Microbiological and Nutritional Outlook. *J. Dairy Sci.* 90, 17–38. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-478>

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

Oglesbee et al 2016 Oglesbee, R. A., C. J. Bittner, F. H. Hilscher, G. E. Erickson, J. C. MacDonald, and M. K. Luebbe. 2016. Evaluation of distillers grains components singly or in combination in a calf fed feedlot study. *Neb. Beef Cattle Rep.* 124-127. <https://digitalcommons.unl.edu/animalscinbcr/899/>

Owens, F. N., D. S. Secrist, W. J. Hill, D. R. Gill. 1998. Acidosis incattle: A review. *J. Anim. Sci.* 76:275–286 <https://doi.org/10.2527/1998.761275x>

Penner, G.B., Yu, P., Christensen, D.A., 2009. Effect of replacing forage or concentrate with wet or dry distillers' grains on the productivity and chewing activity of dairy cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2009.05.006>

Peter, C.M., Faulkner, D.B., Merchen, N.R., Parrett, D.F., Nash, T.G., Dahlquist, J.M., 2000. The effects of corn milling coproducts on growth performance and diet digestibility by beef cattle, *J. Anim. Sci.* 78, 1-6. <https://doi.org/10.2527/2000.7811>

Russel, J.B. and Sniffen, C.J., 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria in vitro. *J. Dairy Sci.*, 67: 987-994. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(84\)81397-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(84)81397-1)

Russell J.B. and Wallace R.J. 1997. Energy-yielding and energy-consuming reactions. In: Hobson P.N. *The rumen microbial ecosystem*, Elsevier Applied Science, London p. 246-273. <https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7>

Russell J.B., O'Connor, J.D., Sniffen, C.J., Fox, D.G., Chalupa, W., 1993. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant Fermentation. *J. Anim. Sci.* 70, 3551–3561. <https://doi.org/10.2527/1992.70113551x>

Silva, A.L., Detmann, E., Rennó, L.N., Pedrosa, A.M., Fontes, M.M.S., Morais, V.C., Sguizzato, A.L.L., Abreu, M.B., Rotta, P.P., Marcondes, M.I., 2018. Effects of rumen undegradable protein on intake, digestibility and rumen kinetics and fermentation characteristics of dairy heifers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 244, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.019>

Sniffen C. J., O'Connor J. D., Van Soest P. J., Fox D. G., Russell J. B., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability, *J. Anim. Sci.*, 11, 3562–3577. <https://doi.org/10.2527/1992.70113562x>

Sung, H.G., Kobayashi, Y., Chang, J., Ha, A., Hwang, I.H., Ha, J.K., 2007. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 20, 200–207. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.200>

Trenkle, A. H., 1997. Evaluation of wet distillers grains in finishing diets for yearling steers. Beef Research Rep. Iowa State Univ., Ames, 637, 93-96.

https://lib.dr.iastate.edu/beefreports_1997/

Uwituze, S., Parsons, G.L., Shelor, M.K., Depenbusch, B.E., Karges, K.K., Gibson, M.L., Reinhardt, C.D., Higgins, J.J., Drouillard, J.S., 2010. Evaluation of dried distillers grains and roughage source in steam-flaked corn finishing diets. J. Anim. Sci. 88, 258–274. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1342>

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74, 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)

Vander Pol, K.J., Luebke, M.K., Crawford, G.I., Erickson, G.E., Klopfenstein, T.J., 2009. Performance and digestibility characteristics of finishing diets containing distillers grains, composites of corn processing coproducts, or supplemental corn oil. J. Anim. Sci. 87, 639–652. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1036>

Verbic, J., Chen, X.B., MacLeod, N.A. and Ørskov, E.R., 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants: effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. J. Agric. Sci., 114, 243–248. <https://doi.org/10.1017/S0021859600072610>