



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ENZIMAS AMIOLÍTICAS NA ENSILAGEM DE MILHO REIDRATADO  
ARMAZENADA POR DIFERENTES PERÍODOS

JAMILLE DÉBORA DE OLIVEIRA BATISTA

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia – Área de Concentração:  
Produção Animal, como parte das  
exigências para obtenção do título  
de Mestre em Zootecnia.

**DOURADOS – MS**  
**FEVEREIRO – 2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ENZIMAS AMIOLÍTICAS NA ENSILAGEM DE MILHO REIDRATADO  
ARMAZENADA POR DIFERENTES PERÍODOS

JAMILLE DÉBORA DE OLIVEIRA BATISTA  
Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra  
Coorientador: Prof. Dr. Rafael Henrique Tonissi e Buschinelli de Goes

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia – Área de Concentração:  
Produção Animal, como parte das  
exigências para obtenção do título  
de Mestre em Zootecnia

**DOURADOS – MS**  
**FEVEREIRO – 2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

B333e Batista, Jamille Debora De Oliveira

Enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenadas por diferentes períodos:  
Dourados, MS, 2019, 86f [recurso eletrônico] / Jamille Debora De Oliveira Batista. -- 2019.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Jefferson Rodrigues Gandra.

Coorientador: Rafael Henrique Tonissi e Buschinelli de Goes.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2019.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Digestibilidade. 2. Silagem. 3. Amido. 4. Amilase. I. Gandra, Jefferson Rodrigues. II. Goes, Rafael Henrique Tonissi E Buschinelli De. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

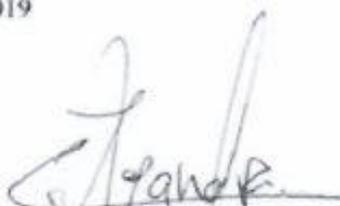
ENZIMAS AMIOLÍTICAS NA ENSILAGEM DE MILHO REIDRATADO  
ARMAZENADAS POR DIFERENTES PERÍODOS

por

**JAMILLE DÉBORA DE OLIVEIRA BATISTA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título  
de MESTRE EM ZOOTECNIA

Aprovado em: 22/02/2019



---

Dr. Jefferson Rodrigues Gandra  
Orientador – UFGD/FCA



---

Dr. Rafael Henrique de Tonissi e Buschinelli de Goes  
UFGD/FCA



---

Dr. Tiago Antônio Del Valle  
USP/VNP

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

**Jamille Débora de Oliveira Batista.** Filha de Djenane Rubia de Oliveira e Jarinaldo Nobre Batista, nascida em 11 de maio de 1994 na cidade de Santarém-PA. Concluiu o ensino médio em 2010 e em 2012 ingressou no curso de Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal do Oeste do Pará, *Campus Santarém*, onde concluiu o curso em 2017. Neste mesmo ano, iniciou as atividades como aluna no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Grande Dourados, onde foi bolsista Capes durante um ano.

*Dedico esta conquista a  
minha amada família. Mas em especial,  
ao meu querido Vô José (In Memória).*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida, e também por toda resiliência que me manteve firme nessa jornada.

Aos meus queridos pais, por tudo que fizeram e fazem por mim, sempre apoiando e acreditando nos meus sonhos, sem medir esforços para me ajudar. Aos meus irmãos, por sempre acreditarem em mim. Aos meus avós, por tudo que representam na minha vida e na vida de toda minha família, e que intercedem por mim todos os dias.

Ao meu noivo, por toda compreensão e afeto em todos os momentos dessa caminhada, mas especialmente por ser o meu refúgio nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Professor Dr. Jefferson Rodrigues Gandra, pela confiança, atenção e paciência, mas especialmente por sua amizade durante este período.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em especial ao Professor Dr. Euclides Oliveira, Dr. Mábio Silvan e Dr. Rafael Goes, pelos ensinamentos repassados.

A “Maria” Kélen, Mayra, Danielle e, especialmente, ao Jhon, por estarem sempre disponíveis e me ajudarem ao longo do experimento.

Aos queridos, Juninho, Anderson, Andrei, Larissa, Nara, Karoline, Paloma e Isabelle, que por muitas vezes salvaram os meus dias de serem dias ruins.

Aos meus amigos, que apesar de longe, são os que na verdade estão mais próximos de mim. Que apesar da distância e de toda a correria do dia-a-dia, jamais deixam de ser amigo de fato e estão sempre torcendo pelas minhas realizações, como eu torço por cada um deles. Com certeza vocês são um grande presente na minha vida!

A Universidade Federal da Grande Dourados, pela oportunidade de realização de meu curso de Mestrado.

A CAPES, por financiar parte deste trabalho.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na minha trajetória.

**Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

<b>CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....</b>	<b>16</b>
<b>1 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
1.1 Importância do grão de milho .....	19
1.2 Processamento do grão de milho .....	20
1.3 Milho reidratado e ensilado.....	22
1.4 Perfil microbiológico da silagem .....	23
1.4.1 Microrganismos desejáveis.....	24
1.4.2 Microrganismos indesejáveis.....	25
1.5 Inoculantes na silagem de grãos.....	27
1.6 Enzimas na alimentação animal .....	29
1.6.1 Enzimas amilolíticas.....	30
<b>2 HIPÓTESE .....</b>	<b>31</b>
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>32</b>
3.1 Objetivo Geral.....	32
3.2 Objetivos Específicos.....	32
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

### CAPÍTULO II

<b>RESUMO.....</b>	<b>41</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>41</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
2.1. <i>Preparo da silagem</i> .....	44
2.2. <i>Perdas fermentativas</i> .....	45
2.3. <i>Estabilidade aeróbia</i> .....	45
2.4. <i>Valor nutricional</i> .....	46
2.5. <i>Perfil fermentativo</i> .....	47
2.6. <i>Análise microbiológica</i> .....	47
2.7. <i>Análise enzimática</i> .....	48
2.8. <i>Análise estatística</i> .....	49
<b>3 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
3.1. <i>Perdas fermentativas</i> .....	49

3.2. Estabilidade aeróbia .....	50
3.3. Valor nutricional .....	52
3.4. Perfil Fermentativo .....	52
3.5. Microbiologia.....	54
3.6. Atividade enzimática .....	54
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
4.1. Perdas fermentativas.....	54
4.2. Estabilidade aeróbia .....	56
4.3. Valor nutricional .....	57
4.4. Perfil fermentativo .....	60
4.5. Microbiologia.....	63
4.6. Atividade enzimática .....	64
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>64</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- BAL – Bactérias do ácido láctico  
BAP – Bactérias do ácido propiônico  
CHO - Carboidratos  
CNF – Carboidratos não fibroso  
CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono  
CON - Controle  
DivMS – Digestibilidade in vitro da matéria seca  
EB – Energia bruta  
ED – Energia digestível  
EE – Extrato etéreo  
EFLU - Efluente  
EL<sub>L</sub> – Energia líquida da lactação  
EM – Energia metabolizável  
FDA – Fibra de detergente ácido  
FDN – Fibra de detergente neutro  
g - Gramas  
GLU - Glucoamilase  
H<sub>2</sub> – Hidrogênio  
kg – Quilogramas  
Mcal – Megacalorias  
mg – Miligramas  
Mmol - Milimol  
MN – Matéria natural  
MO – Matéria orgânica  
MS – Matéria seca  
NDT – Nutrientes digestíveis totais  
N-NH<sub>3</sub> – Nitrogênio amoniacal  
O<sub>2</sub> – Oxigênio  
PB – Proteína bruta  
REC - Recuperação  
 $\alpha$ -AMI – Alfa-amilase

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Composição química média do grão de milho seco indicado nas estruturas físicas específicas do grão.....	19
Tabela 2. Populações típicas de grupos bacterianos e fúngicos em plantas antes da ensilagem.....	24
Tabela 3. Microrganismos estudados como inoculante em silagens.....	28

### CAPÍTULO II

Tabela 4. Composição química do milho reidratado e ensilado ( $\text{g kg}^{-1}$ MS).....	72
Tabela 5. Perdas fermentativas de acordo com os tratamentos experimentais .....	73
Tabela 6. Valor nutricional de acordo com os tratamentos experimentais .....	74
Tabela 7. Perfil microbiano e fermentativo de acordo com os tratamentos experimentais .....	75

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas .....	31
---	----

### CAPÍTULO II

Figura 2. Perda de gases ( $\text{g kg}^{-1}\text{MS}$ ) em função dos tratamentos ao longo do período experimental.....	76
Figura 3. Perdas totais ( $\text{g kg}^{-1}\text{MS}$ ) em função dos tratamentos ao longo do período experimental.....	76
Figura 4. Regressão polinomial simples das perdas totais ( $\text{g kg}^{-1}\text{MS}$ ) em relação ao tempo de armazenamento da silagem de grão de milho reidratado. ....	77
Figura 5. Teor de MS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais.....	77
Figura 6. Concentração de pH no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais.....	78
Figura 7. Variação da diferença de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) da silagem e do ambiente, no período de exposição ao oxigênio, em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais. ....	78
Figura 8. Teor de MS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais.....	79
Figura 9. Concentração de pH no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais.....	79
Figura 10. Variação da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais. ....	80
Figura 11. Teor de MS ( $\text{g kg}^{-1}\text{MS}$ ) ao longo do período experimental.....	80
Figura 12. Teor de amido ( $\text{g kg}^{-1}\text{MS}$ ) ao longo do período experimental.....	81
Figura 13. Regressão polinomial simples da DIVMS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em relação ao tempo de armazenamento da silagem de grão de milho reidratado .....	81
Figura 14. Concentração de pH nos tratamentos ao longo do período experimental. ....	82
Figura 15. Níveis de etanol ( $\text{mmol g kg}^{-1}\text{MS}$ ) ao longo do período experimental.....	82
Figura 16. Níveis de lactato ( $\text{mmol g kg}^{-1}\text{MS}$ ) ao longo do período experimental.....	83
Figura 17. Níveis de acetato ( $\text{mmol g kg}^{-1}\text{MS}$ ) ao longo do período experimental. ....	83

Figura 18. Níveis de propionato ( $\text{mmol g kg}^{-1}$ MS) ao longo do período experimental. 84	84
Figura 19. População de BAL ( $\log_{10}$ ) ao longo do período experimental. .... 84	84
Figura 20. População de fungos ( $\log_{10}$ ) ao longo do período experimental. .... 85	85
Figura 21. Atividade amilolítica ( $\text{UI g}^{-1}$ ) ao longo do período experimental. .... 85	85
Figura 22. Teores de açúcar redutor (mg glicose) ao longo do período experimental.... 86	86

## RESUMO

BATISTA, Jamille Débora de Oliveira. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, fevereiro de 2019. **Enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenada por diferentes períodos**. Orientador: Dr. Jefferson Rodrigues Gandra; Co-orientador: Dr. Rafael Henrique Tonissi e Buschinelli de Goes.

Com o maior uso de ferramentas tecnológicas nos sistemas de produção animal, a silagem de milho transformou-se no alimento volumoso de maior ocorrência e utilização no Brasil. Mas, apesar das características que tornam o milho um alimento muito utilizado na nutrição animal e o principal ingrediente na confecção de silagens, a maioria dos híbridos cultivados no Brasil possui alta vitreosidade, o que limita a sua digestibilidade. Por esse motivo, a adição de compostos enzimáticos na dieta animal tem sido utilizada mais frequentemente. Assim, objetivo deste experimento foi avaliar os efeitos de enzimas amilolíticas e do tempo de armazenamento sobre as perdas fermentativas, estabilidade aeróbica, composição químico-bromatológico, perfil fermentativo e microbiológico e atividade enzimática da silagem de milho reidratado. Foram utilizados 120 silos experimentais, divididos em 3 tratamentos: 1- COM (sem adição de enzima amilolítica); 2-  $\alpha$ -AMI (amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>); 3- GLU (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>). Todos os silos foram inoculados com *L. plantarum* ( $4,0 \times 10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup>) e *P. acidipropionici* ( $2,6 \times 10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup>) adicionado a 4 g t<sup>-1</sup>. Os silos foram abertos a cada 30 dias durante 240 dias de armazenamento. Os dados foram submetidos a análise de variância utilizando-se o PROC MIXED do SAS 9.3. Longos períodos de armazenamento e a adição de amilases influenciaram negativamente as perdas fermentativas, a estabilidade aeróbica, reduziu os teores de MS, amido, CNF, DIVMS e aumentaram as concentrações de PB, EE, lignina e EB. Houve redução do pH, acetado e butirato e aumento na concentração do etanol e lactato comparando os silos acrescidos de enzimas ao controle. A inclusão de enzimas não aumentou a população de bactérias ácido lácticas e não estabilizou a população de fungos e leveduras ao longo do tempo. Dessa forma, ao longo do tempo as modificações ocasionadas pela inclusão das enzimas alteraram mais de forma negativa os aspectos avaliados do alimento, por isso mais estudos são necessários para entender o funcionamento desses compostos dentro do silo e assim poder definir modelos que tonem seu uso mais efetivo.

**Palavras-chaves:** digestibilidade, ensilagem, amido, amilase

## ABSTRACT

With the greater use of technological tools in animal production systems, corn silage has become the most prevalent and most prevalent food in Brazil. However, despite the characteristics that make maize a food used in animal nutrition and the main ingredient used in the manufacture of silage, most of the hybrids grown in Brazil have high vitreous, which limits their digestibility. For this reason, the addition of enzyme compounds to the animal diet has been used more frequently.

This study aimed to evaluate amylolytic enzyme and storage time effects on fermentative losses, aerobic stability, nutritional value, fermentative and microbiological profile and enzymatic activity in rehydrated ground corn silage. One hundred and twenty experimental silos were prepared, divided in three treatments: 1- CON (without enzyme); 2-  $\alpha$ -AMI, ( $\alpha$ -amylase, Kerazyme 3035, 300 mL t<sup>-1</sup> of fresh matter); 3 - GLU, (glucoamylase, Kerazyme 4560, 300 mL t<sup>-1</sup> of fresh matter). All silos were also inoculated with *L. plantarum* ( $4.0 \times 10^{10}$  ufc g<sup>-1</sup>) and *P. acidipropionici* ( $2.6 \times 10^{10}$  ufc g<sup>-1</sup>) added at 4 g t<sup>-1</sup> of hydrated ground corn. The silos were opened every 30 days during the period of 240 days of storage. Data were submitted to analysis of variance using the PROC MIXED of SAS 9.3. Long periods of storage and addition of amylases negatively influenced fermentation losses, aerobic stability, reduced DM, starch, CNF, IVDMD and increased CP, EE, EB and lignin. There was a reduction of pH, acetate and butyrate and increase in ethanol and lactate concentration comparing the silos plus enzymes to the control. The inclusion of enzymes did not increase the population of lactic acid bacteria and did not stabilize the population of fungi and yeasts over time. Thus, over time the modifications caused by the inclusion of the enzymes have altered more negatively the evaluated aspects of the food, therefore more studies are necessary to understand the functioning of these compounds inside the silo and thus to be able to define models that take more use effective.

**Key-words:** digestibility, silage, starch, amylase

## CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A importância econômica e nutricional do grão de milho (*Zea mays*) é caracterizada pelas diversas formas de utilização, as quais incluem desde a alimentação animal até a indústria farmacêutica de alta tecnologia (PAES, 2006). Na pecuária leiteira o grão de milho é uma das principais fontes energéticas utilizadas nas dietas, principalmente devido ao alto teor de amido em sua composição química. No entanto, a sua digestibilidade varia de 70 a 100% (FIRKINS et al., 2001). Entre os principais fatores que afetam a digestibilidade do amido de milho estão o método de armazenamento, os métodos de processamento de grãos, o tamanho das partículas e o tipo de endosperma (PHILIPPEAU; LANDRY; MICHALET-DOREAU, 2000; CORREA et al., 2002; NGONYAMO-MAJEE et al., 2008; ARCARI et al., 2016b).

No Brasil, a maioria dos híbridos de milho cultivados possui alta vitreosidade, ou seja, são do tipo duro ou “*flint*” (CORREA et al., 2002; PEREIRA et al., 2004). E nos últimos anos têm sido demonstrados os benefícios do processamento dos grãos de cereais, com o aumento da digestibilidade do amido, resultando em maior produção de AGVs e energia para os animais (Zinn, 1990; Owens et al., 1997).

Então, ao visar o melhoramento dos aspectos nutricionais e buscando uma alternativa para minimizar o problema da dificuldade de armazenamento no período da safra, temos como alternativa de processamento a ensilagem. A adoção dessa técnica justifica-se pelo fato de que a armazenagem dos grãos na forma de silagem, em condições de manejo adequado, permite eliminar ou reduzir drasticamente o desenvolvimento de fungos e, por consequência, evitar a contaminação da ração com micotoxinas, que é um dos graves problemas que acomete o milho em armazéns (REIS et al., 2001). Além disso, devido a sua alta produtividade de matéria seca, facilidade de cultivo, disponibilidade de híbridos adaptados aos diferentes ambientes e, principalmente, pela facilidade de fermentação natural e bom consumo pelos animais, no Brasil e no mundo, o milho se tornou o tipo mais utilizado para este processamento (RESENDE et al., 2017).

A utilização de grãos de milho úmidos para confecção de silagem, que consiste na colheita e ensilagem dos grãos logo após atingir a maturação fisiológica (teor de umidade em torno de 25 a 30%) (GOBETTI et al., 2013) apresenta vantagens em comparação ao grão convencional seco, como, por exemplo, a maximização do uso da

terra, menor tombamento de plantas, menor ataque de insetos e eliminação das etapas de pré-limpeza e secagem, o que pode garantir uma maior economia em relação ao uso de grãos secos (JOBIM; REIS 2001). Porém, apesar desses aspectos positivos, existem pontos negativos que acabam dificultando a utilização dos grãos úmidos, e neste cenário a hidratação e ensilagem dos grãos de milho em estágio maduro surge como uma opção.

A silagem de milho reidratado, permite a compra estratégica em momentos de baixa nos preços do milho, permite também contornar o problema da estreita janela de colheita dos grãos (MORAIS, 2016), assim como minimiza as perdas quantitativas e qualitativas em função do ataque de insetos e ratos (JOBIM; BRANCO; SANTOS, 2003), além de possuir baixo custo de estocagem (BIAGGIONI et al., 2009). A ensilagem de grãos reidratados aparece como uma ferramenta importante para aumentar a digestibilidade dos nutrientes do milho, porém é necessário o entendimento das peculiaridades dessa fermentação (MORAIS, 2016).

Por isso, a utilização de aditivos enzimáticos na dieta animal pode auxiliar no processo digestivo melhorando a digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes presentes na silagem, com o intuito de melhorar o desempenho dos nutrientes. Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar a ação de enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenada por diferentes períodos.

## **CAPÍTULO I**

### **REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Importância do grão de milho

O milho é um dos cereais mais cultivados do mundo e sua importância está relacionada com sua diversidade de utilização, desde a alimentação até a indústria de alta tecnologia. Na safra 2017/18 o Brasil ocupou o terceiro lugar na produção mundial, alcançando 83 milhões de toneladas (USDA, 2018). A geração de números tão expressivos incentiva avanços significativos no entendimento de sua composição, tendo sido o milho vastamente estudado e melhorado geneticamente para atender ou otimizar os seus diversos usos finais (PAES, 2006, 2008).

A caracterização dos potenciais e aspectos limitantes, assim como as estruturas que compõem o grão do milho é importante no âmbito da nutrição animal (PATTON; PATTON; BOUCHER, 2012). Os grãos do milho são, geralmente, amarelos ou brancos, e o peso individual do grão varia de 250 a 300 mg. Sua composição média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibra e 4% de óleo (PAES, 2006). O grão de milho é constituído por uma camada fibrosa chamada de pericarpo (5% do grão); pelo gérmen ou embrião, rico em proteína (11% do grão); e pelo endosperma, constituído de proteínas e amido (75 a 80% do grão) (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Tabela 1. Composição química média do grão de milho seco indicado nas estruturas físicas específicas do grão.

Componentes do grão	Endosperma (%)	Germe (%)	Pericarpo (%)	Pedicelo (%)	Grão Inteiro (%)
Amido	86,40	8,20	7,30	5,30	71,50
Proteína	9,40	18,80	3,70	9,30	10,30
Óleo	0,80	34,50	1,00	3,80	4,80
Açúcar	0,64	10,80	0,34	1,54	1,97
Cinza	0,31	10,10	0,84	1,56	1,44
Inteiro	81,90	11,90	5,30	0,80	99,9

Fonte: Carvalho; Nakagawa (2000).

O amido é o principal carboidrato (CHO) do grão do milho e representa em torno de 70 a 80% da matéria seca (MS) na maioria dos grãos de cereais (ZEOULA et al., 1999; PEREIRA et al., 2004; ARCARI et al., 2015).

A principal proteína de reserva do milho, que constitui cerca de 60 a 80% das proteínas totais, são as zeínas que estão localizadas no endosperma do grão, na forma de corpos proteicos (GIBBON; LARKINS, 2005) e relacionada com diferenças na dureza dos grãos de cereais (PRATT et al., 1995).

As zeínas se localizam exteriormente aos grânulos de amido no endosperma. Em milho de endosperma farináceo os grânulos de amido são esferas dispersas no endosperma, enquanto que em endosperma vítreo os grânulos de amido são helicoidais e adensados. Como a ligação entre os grânulos de amido e as prolaminas (zeínas) é muito forte no endosperma vítreo, nem água penetra entre os grânulos, e nem as amilases e maltases necessárias para que ocorra a quebra enzimática do amido a glicose (MCALLISTER et al., 2001). Assim, quanto maior a vitreosidade do endosperma dos grãos, maior é a presença de prolamina envolvendo os grânulos de amido e menor a digestibilidade do amido (PEREIRA, 2012; ANDRADE, 2013;).

Além das características de endosperma do milho, o tipo de processamento também exerce influência sobre a digestibilidade do amido (OWENS; ZINN; KIM, 1986; THEURER, 1986). Sendo assim, o processamento destes grãos apresenta muitos benefícios, melhorando a eficiência de utilização de nutrientes dos alimentos pelos microrganismos ruminais e pelo trato digestório total (CORREA et al., 2002; PEREIRA, 2012; ANDRADE, 2013).

## **1.2 Processamento do grão de milho**

O processamento de grãos na alimentação animal é praticado há vários anos, com a finalidade de melhorar o consumo e o aproveitamento dos alimentos pelos animais, principalmente no caso dos ruminantes (HALE, 1973; MARQUES, 2011), e pode ser definido como qualquer processo físico que modifica a composição química ou a estrutura física dos grãos (THEURER, 1986).

O processamento do grão de milho seja por aumento da umidade, temperatura e/ou pressão, apresenta efeitos positivos sobre a digestibilidade ruminal, pós-ruminal e total do amido (THEURER et al., 1999; ZINN; OWENS; WARE, 2002; FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013;), já que a maior exposição dos grânulos de amido facilita os processos enzimáticos de degradação e digestão pela microbiota ruminal (BEAUCHEMIN et al., 1994).

Há diversos tipos de processamentos de grãos e os métodos podem ser classificados em processamento a seco – como quebrar, moer, tostar e peletizar – e processamentos úmidos – como flocular, expandir e cozer sob pressão (HALE, 1973). As melhorias estão relacionadas a maior área de contato, distúrbios na matriz proteica que circunda os grânulos de amido e à desorganização das ligações que aumenta o acesso das bactérias do rúmen aos substratos (THEURER et al., 1999). Além da melhoria da digestibilidade dos alimentos por meio da quebra das barreiras que impedem o acesso enzimático aos componentes nutricionais, o processamento melhora os aspectos de conservação e de palatabilidade dos alimentos (POND et al., 1995) e relacionado a degradação ruminal do amido, proporciona aumento na disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen, podendo alterar a produção de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais (NOCEK; TAMMINGA, 1991)

Entretanto, a maioria dos processamentos do milho que não utilizam calor, umidade e pressão ou a combinação destes, atuam com pouca efetividade sobre a barreira imposta pela matriz proteica, que recobre os grânulos de amido na região do endosperma denominada vítrea (ARCARI et al., 2015).

A produção de ruminantes no mundo é influenciada, ao longo do ano, pela quantidade de alimento que o produtor dispõe para ser utilizado pelos rebanhos. Em alguns países, como o Brasil, grande parte da produção de ruminantes é à base de pastagens e acompanha a disponibilidade desta, assim, o uso de alimentos conservados tem sido amplamente recomendado para serem utilizados nos períodos críticos, desde que sejam usados de forma adequada para evitar prejuízos no processo de produção, e, neste cenário, o uso de silagens têm recebido maior ênfase por parte dos pecuaristas, por exigir tecnologia simples e apresentar excelentes resultados (RÊGO; OLIVEIRA; SIGNORETTI, 2015).

Alguns estudos sugerem a hipótese de que a zeína pode ser degradada no processo de ensilagem (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998; JURJANZ; MONTEILS, 2005; DER BEDROSIAN; NESTOR; KUNG, 2012), permitindo assim maior acesso das bactérias ruminais aos grânulos de amido. As zeínas podem, potencialmente, ser degradadas e/ou solubilizadas no processo de ensilagem por atividade proteolítica bacteriana ou solubilização por compostos orgânicos gerados no processo fermentativo. Embora este tipo de proteína seja hidrofóbica e insolúvel em água ou líquido ruminal, é

solúvel em ácido láctico e ácido acético que são encontrados nas silagens como produtos da fermentação (LAWTON, 2002).

A ensilagem do grão de milho em estágio de maturidade (35 – 38% MS) representa uma alternativa não só para a gelatinização do amido, mas também para a indução a degradação da matriz proteica que envolve o grânulo de amido (HOFFMAN et al., 2011). A proteólise, devido à ação de enzimas das plantas ou pela ação das proteases das bactérias, é outro mecanismo intrínseco à fermentação de silagens de milho com alta umidade, que pode induzir a degradação de proteínas (VIERSTRA, 1996). Porém, a confecção da silagem de grão úmido pode apresentar limitações tanto operacionais quanto climáticas. Dessa forma, uma saída seria a reidratação do milho colhido com elevado teor de MS, processado por moagem, reidratado e ensilado. Esta técnica permite flexibilizar e viabilizar as eventuais limitações ligadas à falta de equipamentos eficazes para colher milho com umidade alta, necessidade de processamento mais intenso, atrasos na colheita, adversidades climáticas ou a impossibilidade de produção do grão na propriedade. A reconstituição do milho é o tipo de processamento utilizado, principalmente, em sistemas de confinamento de bovinos (BENTON et al., 2005; ARCARI et al., 2015).

### **1.3 Milho reidratado e ensilado**

A reidratação do milho integra o grupo de processamentos úmidos (FRANZONI, 2012). Através dessa técnica ocorre o reumedecimento dos grãos secos até o teor de umidade adequado para ensilagem, ou seja, devolve-se aos grãos maduros, secos e moídos umidade entre 30 e 40% da MN, (ANDRADE FILHO et al., 2010), suficiente para que essa massa seja apta a fermentar e ser conservada pelo processo da ensilagem (DEFFOR; BROWN; OWENS, 2006). Nessa situação, é possível encontrar melhor digestibilidade da MS e degradabilidade da proteína (BENTON et al., 2005).

Os grãos de milho, ao alcançarem a maturidade fisiológica com uma concentração de umidade em torno de 34% no milho dentado e 37% no milho duro, não sofrem mais alteração nos seus teores de amido (PHILIPPEAU; LANDRY; MICHALET-DOREAU, 2000). Isso demonstra que o milho colhido com alta umidade e o reidratado, provavelmente vão ter concentrações de amido semelhantes (ARCARI et al., 2016a).

O processo de reconstituição do milho pode representar uma alternativa viável, agregando benefícios aos pecuaristas. Os sistemas tradicionais de armazenagem de milho seco são suscetíveis ao ataque de vários insetos e roedores e a tendência é que ocorram, após alguns meses de acondicionamento impróprio, significativas perdas qualitativas e quantitativas (LOPES et al., 2005). De acordo com Lazzari; Lazzari (2001) os insetos mais comuns que atacam o milho seco armazenado são os carunchos (*Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae*), besouros (*Rhyzopert hadominica*, *Tribolium castaneum*, *Oryzaeophilus surinamensis*, *Cryptolestes ferrugineous*) e as traças-de-cereais (*Sitotroga cerealella*, *Plodiainter punctella*). Estes insetos não são encontrados na silagem de grãos úmidos por razões de ausência de oxigênio (O<sub>2</sub>) e acidez do meio.

A produção da silagem de grãos reidratados se inicia com a moagem bem fina dos grãos e adição de água (30%) realizando-se mistura bem homogênea, formando uma pasta que será colocada no silo. Adiciona-se então o inoculante para silagem e realiza-se a compactação e fechamento hermético do silo. Durante a ensilagem ocorre proteólise da matriz proteica que envolve os grânulos de amido pelas enzimas microbianas, aumentando a digestibilidade ruminal do amido (FRANZONI, 2012).

É importante ressaltar que uma prática fundamental para a qualidade da silagem de grão reidratado é a homogeneização da água ao grão moído. Caso a água seja incorporada ao milho moído por mistura não vigorosa, a hidratação do grão não será perfeita, e pode resultar em perda do ensilado por crescimento de fungos (ANDRADE, 2013).

A reconstituição de grãos vem sendo utilizada como alternativa para garantir a manutenção da qualidade nutricional nas propriedades rurais, em função das dificuldades de armazenagem do grão seco (SILVA et al., 2014).

#### **1.4 Perfil microbiológico da silagem**

Diversos fatores influenciam a qualidade final da silagem, dentre eles o material ensilado, o processo de ensilagem e o perfil fermentativo – que está relacionado com a capacidade tamponante, o conteúdo de MS e CHO solúveis e com a atividade microbiana (DRIEHUIS; VAN WIKSELAAR, 2000). A população epifítica presente na forragem é bastante variável e afeta diretamente a dinâmica da fermentação (MUCK,

2010). Classes típicas de microrganismos e a faixa de suas populações na ensilagem são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Populações típicas de grupos bacterianos e fúngicos em plantas antes da ensilagem

Grupo	População (UFC/g forragem)
Bactérias aeróbias totais	>10.000.000
Bactérias do ácido lático	10 – 1.000.000
Enterobactérias	1000 – 1.000.000
Leveduras e fungos semelhantes a leveduras	1000 – 100.000
Fungos filamentosos (bolores)	1000 – 10.000
Clostrídios (endósporos)	100 – 1.000
<i>Bacillus</i> (endósporos)	100 – 1.000
Bactérias do ácido acético	100 – 1.000
Bactérias do ácido propiônico	10 – 1.000

Adaptado de Pahlow et al., (2003)

Basicamente, o perfil microbiológico da silagem pode ser dividido em dois grandes grupos de microrganismos: 1) desejáveis, aqueles que os produtos obtidos durante a fermentação são favoráveis a manutenção da qualidade da silagem; e 2) indesejáveis, que vão atuar na degradação da silagem, (OUDE ELFERINK et al., 1999a; MOMBACH, 2014).

#### 1.4.1 *Microrganismos desejáveis*

As bactérias do ácido lático (BAL) são microrganismos que crescem em condições microaerófilas ou em meios anaeróbico (KLEIN et al., 1998) e representam o principal grupo de indivíduos que atuam no processo fermentativo. Os principais gêneros que compõe este grupo e que são regularmente associados à silagem são: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (PAHLOW et al., 2003).

A principal característica das BAL é a produção do ácido lático como único ou o principal produto de seu metabolismo, e conforme essa produção podem ser divididas em três grupos de acordo com o metabolismo de carboidratos: 1) homofermentativas obrigatórias – metaboliza as hexoses pela via da glicólise, produzindo apenas ácido lático; 2) heterofermentativas obrigatórias – metaboliza as hexoses e pentoses pela via da fosfocetolase e forma lactato e etanol ou acetato e 3) heterofermentativas facultativas

– metaboliza as hexoses via glicólise e pentoses através da via da fosfocetolase (OUDE ELFERINK et al. 2001; PAHLOW et al., 2003).

Alguns gêneros de microrganismos heterofermentativos têm como produtos da fermentação o propionato, o acetato e o CO<sub>2</sub> e por isso recebem a denominação de bactérias do ácido propiônico (BAP), obtendo energia por meio da fermentação tanto de açúcares quanto do próprio ácido láctico presente no meio (MOON, 1983). No geral, a produção desses compostos se dá através do consumo de CHO solúveis da forragem (MUCK, 2010), e pode resultar na produção de gases e na perda de MS e energia (BACH, 2015).

De todo modo, os produtos do metabolismo das BAL, agem sobre o pH da silagem, reduzindo para abaixo de 4,0 em silagens de milho e estando o pH suficientemente baixo, os principais competidores das BAL em condições anaeróbias (enterobactérias, clostrídeos e *bacillus*), são inibidos (MUCK, 2010). Já os produtos das BAP são bastante eficientes na redução das perdas associadas a instabilidade aeróbia em função de sua ação antifúngica, que consegue inibir os principais microrganismos de deterioração aeróbia (leveduras e fungos filamentosos) (DRIEHUIS; OUDE-ELFERINK; VAN WIKSELAAR, 2001). Por isso, de acordo com Pahlow et al., (2003), a microbiota epífita é essencial para a fermentação das silagens. Ela está presente na forragem fresca em estado dormente e os procedimentos da colheita que laceram a planta culminam com a ativação desses microrganismos. Entretanto, estas também podem ser adicionadas por meio de inoculantes, com o objetivo de melhorar as características fermentativas (HENDERSON, 1993).

#### **1.4.2 Microrganismos indesejáveis**

Os microrganismos desse grupo estão associados a perdas durante todas as fases do processo de ensilagem, estando relacionados à 1) deterioração anaeróbia – apresentando elevado consumo de nutrientes (Enterobactérias e os *Clostridium* spp.), ou 2) deterioração aeróbia – leveduras, fungos filamentosos, *Bacillus* spp. e *Listeria* spp. Esses indivíduos além de consumirem os CHO em competição com as BAL e as BAP, degradam as proteínas. Eles podem estar presentes na cultura ou ser oriundos de contaminação. Além disso, são bactérias patogênicas, que podem afetar os animais e as

peessoas que têm contato com a silagem (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

As enterobactérias são anaeróbias facultativas, gram-negativas e muitos dos seus efeitos negativos na silagem ocorrem em condições anaeróbias (MOMBACH, 2014). As bactérias desse gênero são as principais competidoras com as BAL pelos açúcares disponíveis e o produto final de sua fermentação é o ácido acético e não o lático (MUCK, 2010). A presença de enterobactérias é também um indicativo de proteólise, que causa não só uma redução no valor nutricional da silagem, mas também podem levar à produção de compostos tóxicos que reduzem a aceitabilidade do alimento (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991).

Os clostrídeos são bactérias gram-positivas, esporulantes, normalmente móveis, estritamente anaeróbios, que fermentam açúcares, ácidos orgânicos ou proteínas (NETO, 2012). Sua presença na silagem geralmente é resultado da contaminação de solo (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991; MUCK, 2010) e seu crescimento é estimulado pela alta temperatura de estocagem ( $>30^{\circ}\text{C}$ ), baixo teor de MS ( $<30\%$ ), baixo teor de CHO e alta capacidade de tamponamento (PITT et al., 1990). Segundo Oude Elferink et al. (1999) uma silagem com típica atividade clostridiana é caracterizada por altas concentrações de ácido butírico ( $>5 \text{ g kg}^{-1} \text{ MS}$ ), alto pH ( $> 5$ ), baixos teores de MS e alto teor de amônia e amina.

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, anaeróbios facultativos e heterotróficos. Sua importância no processo fermentativo da silagem está relacionada com as perdas durante a fermentação e a deterioração aeróbia durante a fase de abertura (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). No silo fechado, esses microrganismos fermentam os açúcares – produzindo ácido butírico, ácido acético, hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) e  $\text{CO}_2$  – e os aminoácidos – produzindo amônia, aminas e  $\text{CO}_2$  – diminuindo a quantidade de CHO disponíveis para as BAL como também o valor nutritivo da forragem, que reflete em uma menor ingestão pelos animais (MUCK, 2010).

Os principais gêneros de fungos filamentosos que têm sido isolados de silagens são sobretudo *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e o seu crescimento em silagens está associado a locais onde há penetração de ar durante a fase de armazenamento, mas, principalmente, durante a fase de abertura do silo (EL-SHANAWANY; EMAN

MOSTAFA; BARAKAT, 2005). Os fungos são microrganismos eucariotos, estritamente aeróbios (OUDE ELFERINK et al., 1999) que além de consumir o conteúdo celular podem produzir micotoxinas que afetam negativamente o metabolismo animal (REIS et al., 2008).

Os *bacillus* são microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos e assim como os clostrídios formam esporos. O principal efeito desses microrganismos na silagem está relacionado ao avanço na deterioração aeróbia da silagem (MOMBACH, 2014). Segundo Muck (2010) depois da atuação de leveduras e das bactérias formadoras de ácido acético, são os *bacillus* que atuam elevando o pH e a temperatura nos silos.

A presença de bactérias do gênero *Listeria* também tem sido relatada em silagens associadas a deterioração aeróbia. São microrganismos aeróbios ou anaeróbios facultativos (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK, 2000) e seu crescimento e sobrevivência na silagem são determinados pelo grau de anaerobiose e o pH da mesma – sob condições estritamente anaeróbias e a baixos valores de pH, essas bactérias perdem rapidamente a viabilidade (OUDE ELFERINK et al., 2001).

Por todas as ações indesejáveis ocasionadas no silo por microrganismos, o uso de aditivos no processo de ensilagem ganhou o mercado no intuito de: inibir o crescimento de organismos aeróbios; retardar o crescimento de microrganismos anaeróbios indesejáveis; fornecer nutrientes para estimular o crescimento de microrganismos benéficos para que estes possam dominar a fermentação; assim como melhorar a recuperação de nutrientes e de MS, entre outros (KUNG JR et al., 2003).

## **1.5 Inoculantes na silagem de grãos**

Silagens de grão, por apresentarem altos teores de ácido lático e CHO solúveis remanescentes do processo de fermentação, os quais são utilizados como substrato para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, após a abertura do silo, estão sujeitas ao processo de deterioração (SEBASTIAN et al., 1996). Neste aspecto, o conceito do uso de culturas bacterianas como inoculante, para melhorar o perfil de fermentação no processo de ensilagem, é conhecido desde o início do século XX (RÊGO; OLIVEIRA; SIGNORETTI, 2015).

As bactérias utilizadas como inoculante no processo de ensilagem, podem ser divididas basicamente em dois grupos, segundo o produto final formado durante a fase

de fermentação: 1) homofermentativas – que produzem ácido lático (BAL) e 2) heterofermentativas – produtoras de ácidos orgânicos (WEINBERG; MUCK, 1996; RÊGO; OLIVEIRA; SIGNORETTI, 2015).

A utilização de inoculantes bacterianos na ensilagem sempre foi baseada em microrganismos homoláticos, apresentando como principais características a rápida redução do pH e alta produção de ácido lático, minimizando as perdas de matéria seca e acelerando o processo de acidificação da silagem (ANDRADE, 2013). No entanto, problemas relacionados à estabilidade aeróbia levaram a buscas por microrganismos com características distintas (FILYA; SUCU; KARABULUT, 2004).

Abaixo, na Tabela 3 estão listados os microrganismos que têm sido estudados como inoculantes em silagens, com destaque para os gêneros *Lactobacillus* e para *Propionibacterium*, que têm sido amplamente utilizados.

Tabela 3. Microrganismos estudados como inoculante em silagens

Bactéria	Classificação	Principal produto final
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Homofermentativa	Ácido lático
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Homofermentativa	Ácido lático
<i>Enterococcus faecium</i>	Homofermentativa	Ácido lático
<i>Lactobacillus buchneri</i>	Heterofermentativa	Ácido lático, acético, propanediol, CO <sub>2</sub>
<i>Propionibacterium acidipropionici</i>	Heterofermentativa	Ácido propiônico, acético, CO <sub>2</sub>
<i>Propionibacterium shermanii</i>	Heterofermentativa	Ácido propiônico, acético, CO <sub>2</sub>

Fonte: Rêgo; Oliveira; Signoretti, (2015)

O gênero *Lactobacillus* é caracterizado por bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, estritamente fermentativas, anaeróbias e que apresentam complexa exigência nutricional (HAMMES; VOGEL, 1995). *L. plantarum* tem a capacidade de acelerar a acidificação da silagem e reduzir as fermentações secundárias, o que proporciona menor perda de energia. Já *L. buchneri*, além de produzir o ácido acético, tem a capacidade de realizar a assimilação anaeróbia de ácido lático a ácido acético, e esse ácido orgânico exerce efeito antifúngico na silagem (MOON, 1983).

O gênero *Propionibacterium* é caracterizado pela produção dos ácidos acético e propiônico durante a fermentação de CHO solúveis e do ácido lático (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991), e por isso, asseguram um controle da deterioração das silagens após abertura dos silos (MOON, 1983).

As silagens de grãos úmidos representam um substrato de alto valor nutricional para o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis, relacionados a estabilidade aeróbia, por isso, a associação de aditivos microbianos com vias metabólicas diferentes, no intuito de promover aumento da taxa de fermentação e da estabilidade aeróbia das silagens, torna-se condição importante para assegurar uma adequada fermentação aliada à preservação do silo após abertura e exposição ao ar (MORAIS, 2016).

Os efeitos dos inoculantes sobre o perfil microbiano das silagens, possivelmente pode influenciar a degradação de amido nas silagens de milho reidratado (SILVA et al., 2019). Contudo, ainda são poucas as informações sobre o perfil fermentativo e a estabilidade aeróbia das silagens de milho reidratado (REZENDE et al., 2014).

## **1.6 Enzimas na alimentação animal**

Enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos envolvidas nos processos bioquímicos, que dentre outras funções, são capazes de quebrar moléculas complexas em unidades menores, como carboidratos em açúcares (SOARES et al., 2010), ou seja, atuam como catalisadores biológicos ao aumentarem a velocidade de reações químicas no organismo, sem serem alteradas durante o processo (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

As enzimas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação. Embora a maioria das enzimas sejam endocelulares, algumas são exocelulares e são secretadas para fora da célula viva. Grande parte das enzimas utilizadas nas indústrias, por exemplo, são enzimas extracelulares de origem microbiana (SPIER, 2005).

A utilização de aditivos enzimáticos na nutrição animal é feita com o intuito de auxiliar o processo digestivo, melhorando a digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes presentes na dieta. Assim, a sua incorporação, tem sido realizada com a intenção de melhorar o desempenho e a rentabilidade dos alimentos e podem ser classificadas como: 1) enzimas que complementam quantitativamente as enzimas digestórias endógenas dos animais – proteases, amilases e fitases e 2) enzimas complementares, que o organismo não possui capacidade de sintetizar e/ou sintetizam em pequenas quantidades –  $\beta$ -glucanas, pentosanas e  $\alpha$ -galactosidases (CAMPESTRINI; SILVA; APPELT, 2005).

A utilização de suplementos enzimáticos para dietas de ruminantes tem crescido, porém a maioria das pesquisas faz uso principalmente de celulases e hemicelulases, enquanto o processo de digestão do amido ainda tem sido pouco explorado (TRICARICO; JOHNSTON; DAWSON, 2008).

### ***1.6.1 Enzimas amilolíticas***

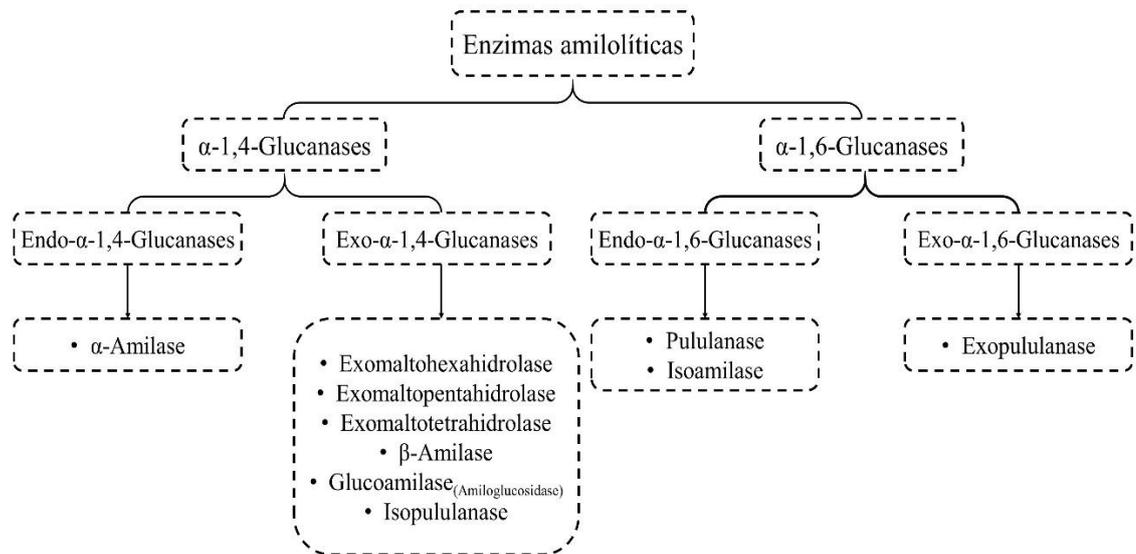
A produção das enzimas amilolíticas iniciou-se em decorrência da ampla distribuição do amido na natureza, e possibilitou que tais compostos pudessem ser encontrados na indústria devida a grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais (KAMEDA et al., 2007).

O termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%). Assim, as enzimas amilolíticas são capazes de degradar a molécula de amido em monossacarídeos como a glucose, dissacarídeos como a maltose e oligossacarídeos como as dextrinas (SPIER, 2005), apresentando importância biotecnológica nas mais diversas áreas (AQUINO et al., 2003; GUPTA et al., 2003).

De acordo com Gupta et al. (2003) as amilases podem ser divididas em dois grupos de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam: 1) endoamilase, que catalisam de forma aleatória as hidrólises no interior da molécula de amido, causando a formação de ramos lineares de oligossacarídeos, em diferentes comprimentos; e 2) exoamilases, que realizam a hidrólise a partir das extremidades não-redutores, resultando em produtos finais pequenos.

Já segundo Kulp (1975) as amilases podem ser divididas em três grupos: 1) as  $\alpha$ -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); 2) as  $\beta$ -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e 3) as glucoamilases (amiloglicosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

Abaixo segue um esquema (Figura 1) para identificar e classificar as enzimas amilolíticas:



Adaptado de Nigam; Singh, (1995)

Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas

Na nutrição de ruminantes, especialmente em sistemas de alta produção, a taxa de inclusão de silagem de milho e de milho em grão na dieta vem crescendo, seja pelos fatores comerciais e características nutricionais, ou pela própria aceitabilidade do alimento. Porém nem todo o amido é digerido no processo de digestão, e no intuito de tornar o alimento mais eficiente, estudos tem sido feito para verificar a viabilidade das enzimas amilolíticas.

Atualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido (GUPTA et al., 2003). Neste cenário, esta linha de pesquisa tenta aliar as vantagens do uso das enzimas, sua especificidade e eficiência catalítica, a metodologias viáveis que regulem sua instabilidade e reduza os custos de sua produção, tornando o seu uso mais efetivo (FREITAS et al., 2018).

## 2 HIPÓTESE

A adição de enzimas amilolíticas vai reduzir as perdas fermentativas e a contagem de fungos e leveduras e aumentar a estabilidade aeróbia e a contagem de BAL, melhorar a composição químico-bromatológica da silagem, assim como vai modificar positivamente o perfil fermentativo da silagem de grão de milho reidratado armazenada por diferentes períodos.

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

No contexto apresentado, o presente estudo teve o objetivo avaliar a ação de enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenada por diferentes períodos.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos deste estudo foram avaliar os efeitos do tempo de armazenamento e a adição de enzimas amilolíticas sobre:

- 1) As perdas fermentativas e a estabilidade aeróbia após a abertura dos silos;
- 2) A composição químico-bromatológica da silagem de milho reidratado;
- 3) O perfil fermentativo (produção de ácidos orgânicos e amônia);
- 4) Variação da população microbiana na silagem;
- 5) A atividade de amilases ao longo do período experimental.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. P. DE. **Silagem de grão de milho reidratado com soro de leite e água**. 2013. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano, 2013.

ANDRADE FILHO, R.; REIS, R.B.; PEREIRA, M.N.; ANTENOR, M. **Degradabilidade ruminal in situ de grãos de milho maduros do tipo flint ou dentado, secos ou reconstituídos e ensilados**. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 47, 2010. **Anais...**Viçosa, Sociedade Brasileira de Zootecnia 2010.

AQUINO, A. C. M. M. et al. Studies on a thermostable  $\alpha$ -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 61, n. 4, p. 323–328, 2003.

ARCARI, M. A. et al. Uso de silagem de milho reidratado em dietas de vacas leiteiras. In: **Novos Desafios da Pesquisa em Nutrição e Produção Animal**. 2015. ed. Pirassununga: Editora 5D, 2015. p. 298–321.

ARCARI, M. A. et al. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 221, p. 167–173, 2016a.

ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 60, 2016b.

BACH, B. C. **Universidade federal do paran  bleine concei o bach perdas fermentativas, microbiologia e composi o químico-bromatológica de silagens de milho**. 2015. 97p. Disserta o (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, 2015.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. **Journal of animal science**, v. 72, n. 1, p. 236–246, 1994.

BENTON, J. R. et al. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. **Nebraska Beef Cattle Reports**, n. January, p. 31–33, 2005.

BIAGGIONI, M. A. M. et al. Qualidade da silagem de grão úmido em fun o da temperatura ambiente e pressão interna de armazenagem. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 377–382, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Decreto n  76.986, de 6 de janeiro de 1976. Inspe o e fiscaliza o obrigatória dos produtos destinados   alimenta o animal. **Diário Oficial da União**, Se o 1, p. 145, 1976.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Am. Soc. Plant Physiol., Rockville, MD. 2000.

- CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M. DA; APPELT, M. D. Utilização De Enzimas Na Alimentação Animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção**. 4. ed ed. Jaboticabal: N. M. de Carvalho; J. Nakagawa, 2000.
- CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: P. C. Champe; R. A. Harvey; D. R. Ferrier, 2006.
- CORREA, C. E. S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 3008–3012, 2002.
- DEFFOR, P. J.; BROWN, M. S.; OWENS, F. N. Reconstitution of grain sorghum for ruminants. **Cattle grain processing symposium**, n. 1972, p. 93–98, 2006.
- DER BEDROSIAN, M. C.; NESTOR, K. E.; KUNG, L. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 9, p. 5115–5126, 2012.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **The Veterinary quarterly**, v. 22, n. 4, p. 212–216, 2000.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S.J.W.H.; VAN WIKSELAAR, P.G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v.56, n.4, p.330-343, 2001.
- DRIEHUIS, F.; VAN WIKSELAAR, P. G. The occurrence and prevention of ethanol fermentation in high-dry-matter grass silage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 6, p. 711–718, 2000.
- EL-SHANAWANY, A. A.; EMAN MOSTAFA, M.; BARAKAT, A. Fungal populations and mycotoxins in silage in Assiut and Sohag governorates in Egypt, with a special reference to characteristic *Aspergilli* toxins. **Mycopathologia**, v. 159, n. 2, p. 281–289, 2005.
- FERRARETTO, L. F.; CRUMP, P. M.; SHAVER, R. D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of dairy science**, v. 96, n. 1, p. 533–50, 2013.
- FILYA, I.; SUCU, E.; KARABULUT, A. The effect of *Propionibacterium acidipropionici*, with or without *Lactobacillus plantarum*, on the fermentation and aerobic stability of wheat, sorghum and maize silages. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 4, p. 818–826, 2004.
- FIRKINS, J. L. et al. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. E-Suppl, p. E218, 2001.
- FRANZONI, A. P. S. **Efeito do processamento do milho e dos teores de fibra no desempenho de bovinos Nelore em terminação**. 2012. 138p. Dissertação (Mestrado) -

Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2012.

FREITAS, P. R. DE et al. Efeito de enzimas amilolíticas de *Aspergillus awamori* sobre a digestão do amido em bovino. **Ciência Agrícola**, v. 12, n. 3, p. 27–34, 2018.

GIBBON, B. C.; LARKINS, B. A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. **Trends in Genetics**, v. 21, n. 4, p. 227–233, 2005.

GOBETTI, S. T. DE et al. Utilização de silagem de grão úmido na dieta de animais ruminantes. **Revista Ambiência**, v. 9, n. 1, p. 225–239, 2013.

GUPTA, R. et al. Microbial  $\alpha$ -amylases: A biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1599–1616, 2003.

HALE, W. H. Influence of processing on the utilization of grains (starch) by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 37, n. 4, p. 1075–1080, 1973.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. **The genus Lactobacillus**. In: WOOD-BRIAN, J. B.; HOLZAPFEL, W. H. (Eds.). . The genera of Lacti Acid Bacteria. 1st. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 19–54.

HENDERSON, N. Silage additives. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, n. 1, p. 35–56, 1993.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 5, p. 2465–2474, 2011.

JOBIM, C. C.; BRANCO, A. F.; SANTOS, G. T. DOS. **Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos leiteiros**. IN: Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite, 5, 2003. **Anais...Goiânia: CBNA**, 2003.

JOBIM, C.C.; REIS, R.A. Produção e utilização de silagem de grãos úmidos de milho. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38., 2001, Piracicaba. **Anais...Piracicaba:Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 2001. p.912-927.

JURJANZ, S.; MONTEILS, V. Ruminal degradability of corn forages depending on the processing method employed. **Journal of Animal Science**, v. 3, p. 15–23, 2005.

KAMEDA, E. et al. Removal of polymeric filter cake in petroleum wells: A study of commercial amylase stability. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 59, n. 3–4, p. 263–270, 2007.

KLEIN, G. et al. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 103–125, 1998.

KULP, K. **Carbohydrases**. In: REED, G. (Ed.). Enzymes in Food Processing. 2. ed. London: Academic Press, 1975. p. 62–87.

KUNG JR, L. et al. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 336–343, 2003.

LAZZARI, F. A., LAZZARI, S. M. N. **Aspectos sanitários da silagem de grãos úmido de milho.** In: **Silagem de grãos úmido de milho.** Curitiba: Ed. Leal Ltda, p. 39-46. 2001.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 1–18, 2002.

LOPES, A. B. R. DE C. et al. Método de reconstituição da umidade de grãos de milho e a composição química da massa ensilada. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 1, p. 95–101, 2005.

MARQUES, R. S. **Efeitos da variação dos níveis de forragem em dietas contendo grãos de milho inteiro e os benefícios da floculação na terminação de tourinhos Nelore.** 2011. 72p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011.

MCALLISTER, T. A. et al. **Enzymes in Ruminant Diets.** In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Eds.). **Enzymes in Farm Animal Nutrition.** 1st. ed. Oxon: Cab International, 2011. p. 273–298.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage.** 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.

MOMBACH, M. A. **Silagem de grão de milho triturado e reidratado contendo glicerina bruta e inoculante microbiano.** 2014. 78p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Mato Grosso, Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais, 2014.

MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, n. 3, p. 453–460, 1983.

MORAIS, G. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras.** 2016. 111p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2016.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. suppl spe, p. 183–191, 2010.

NGONYAMO-MAJEE, D. et al. Relationships between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn germplasm. II. Ruminant and post-ruminant degradabilities. **Animal Feed Science and Technology**, v. 142, n. 3–4, p. 259–274, 2008

NETO, A. DE S. **Caracterização microbiológica, parâmetros fermentativos e estabilidade aeróbia em silagens de forragens tropicais com aditivos microbianos.** 2012. 115p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2012.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing.

**Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 770–778, 1995.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of Digestion of Starch in the Gastrointestinal Tract of Dairy Cows and Its Effect on Milk Yield and Composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3598–3629, 1991.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. **Silage fermentation processes and their manipulation**. IN: Electronic Conference on Tropical Silage, 1999. **Anais...Itália: Food and Agriculture Organization (FAO)**, 1999.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. Anaerobic Conversion of Lactic Acid to Acetic Acid and 1, 2-Propanediol by *Lactobacillus buchneri*. **Applied and environmental microbiology**, v. 67, n. 1, p. 125–132, 2001.

OWENS, F. N.; ZINN, R. A.; KIM, Y. K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1634–1648, 1986.

OWENS, F.N. et al. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.75, p.868-79, 1997.

PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 75).

PAES, M. C. D. **Manipulação da Composição Química do Milho: Impacto na Indústria e na Saúde Humana**. Artigo em Hypertexto. Disponível em <[http://www.infobibos.com/Artigos/2008\\_4/milho/index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/milho/index.htm)>. Acesso em: 4/10/2018, p. 1–5, 2008.

PAHLOW, G. et al. **Microbiology of Ensiling**. In: DWAYNE R. BUXTON; RICHARD E. MUCK; JOSEPH H. HARRISON. (Ed.). . Silage science and technology. Madison, Wisconsin - USA: American Society of Agronomy, Inc.; Crop Science Society of America, Inc.; Soil Science Society of America, Inc., 2003. p. 31–93.

PATTON, R.A.; PATTON, J.R.; BOUCHER, S. E. Defining ruminal and total-tract starch degradation for adult dairy cattle using in vivo data. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 765–782, 2012.

PEREIRA, M. L. R. **Degradabilidade ruminal in vitro de grão reidratado e ensilado de milho e sorgo com diferentes granulometrias**. 2012. 62p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2012.

PEREIRA, M. N. et al. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 358–363, 2004.

PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALETDOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. May 1999, p. 404–408, 2000.

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p. 2178–84, 1998.

- PITT, R.E et al. Silage and hay preservation. Ithaca: Northeast Regional Agricultural Engineering Service, 1990. 53p.
- POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. **Basic Animal Nutrition and Feeding**. 4ª Ed. New York: John Willey and Sons, 1995, p. 353-364
- PRATT, R. C. et al. Association of zein classes with maize kernel hardness. **Cereal Chemistry**, v. 72, n. 2, p. 162–167, 1995.
- RÊGO, A. C.; OLIVEIRA, M. D. S.; SIGNORETTI, R. D. Importância Do Tamanho De Partícula E Do Uso De Inoculante Bacteriano Em Silagens Importance of Particle Size and Use of Bacteria in Inoculant Silages. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 7, n. 1, p. 88–99, 2015.
- REIS, W. DOS et al. Características da carcaça de cordeiros alimentados com dietas contendo grãos de milho conservados em diferentes formas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1308–1315, 2001.
- REIS, R. A. et al. Efeito de doses de Lactobacillus Buchneri “Cepa NCIMB 40788” sobre as perdas nos períodos de fermentação e pós-abertura da silagem de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 923–934, 2008.
- REZENDE, A. V. et al. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science and Technology**, v. 197, p. 213–221, 2014.
- RESENDE, H. et al. **Tecnologia e Custo da Silagem de Milho**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2017. 10p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 114).
- SEBASTIAN, S. et al. Comparative assessment of bacterial inoculation and propionic acid treatment on aerobic stability and microbial populations of ensiled high-moisture ear corn. **Journal of Animal Science**, v. 74, n. 2, p. 447–456, 1996.
- SILVA, J. S. et al. Degradabilidade ruminal in situ do sorgo grão em diferentes formas de reconstituição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1822–1830, 2014.
- SILVA, N. C. et al. Influence of storage length and inoculation with Lactobacillus buchneri on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage. **Animal Feed Science and Technology**, 2019.
- SOARES, I. A. et al. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso Aspergillus nidulans. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010.
- SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2005.
- THEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1649–1662, 1986.

THEURER, C. B. et al. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 9, p. 1950–1959, 1999.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 136–150, 2008.

VIERSTRA, R. D. Proteolysis in plants: Mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, v. 32, n. 1–2, p. 275–302, 1996.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. . New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 53–68, 1996.

ZEOULA, L. M. et al. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 898–905, 1999.

ZINN, R.A. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v.67, p.767, 1990.

ZINN, R. A.; OWENS, F. N.; WARE, R. A. Flaking corn: Processing mechanics, quality standards, and impacts on energy availability and performance of feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, n. 5, p. 1145–1156, 2002.

## **CAPÍTULO II**

### **ENZIMAS AMIOLÍTICAS NA ENSILAGEM DE MILHO REIDRATADO ARMAZENADAS POR DIFERENTES PERÍODOS**

## Enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenadas por diferentes períodos

Jamille Debora O. Batista,<sup>\*,1</sup> Rafael Henrique T. B. Goes,<sup>\*</sup> e Jefferson R. Gandra<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum km 12, Dourados, Brasil. 79804-970

<sup>1</sup>Autor correspondente: [jamilledeboraob@gmail.com](mailto:jamilledeboraob@gmail.com)

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação de enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenadas por diferentes períodos. Foram utilizados 120 silos experimentais, divididos em três tratamentos: 1- CON (sem adição de enzima amilolítica); 2-  $\alpha$ -AMI (amilase, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>); 3- GLU (glucoamilase, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>). Para cada tonelada de silagem foram adicionados 300 ml de enzima. Todos os silos foram inoculados com *L. plantarum* ( $4,0 \times 10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup>) e *P. acidipropionici* ( $2,6 \times 10^{10}$  UFC g<sup>-1</sup>) adicionado a 4 g t<sup>-1</sup>. Os silos foram abertos nos dias 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 de armazenamento. Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o PROC MIXED do SAS 9.3. Ao longo dos diferentes períodos de armazenamento, a adição de enzimas aumentou as perdas fermentativas totais em relação ao controle, reduziu o teor de MS, amido, CNF, DIVMS e aumentou o teor de PB, EE, lignina e EB. A adição de enzimas reduziu o pH, a concentração de acetato e butirato, porém aumentou a concentração de lactato. A inclusão de enzima não aumentou a população de bactérias ácido lácticas e não conseguiu estabilizar a população de fungos. A ação de enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado influenciou negativamente as perdas fermentativas, o valor nutricional e não refletiu sobre a contagem de BAL, assim mais estudos devem ser feitos para se adequar o uso dessa tecnologia a este tipo de alimento.

**Palavras-chaves:** digestibilidade, ensilagem, amido, amilase

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the action of amylolytic enzymes on rehydrated ground corn silage stored for different periods. One hundred and twenty experimental silos were prepared, divided in three treatments: 1-CON (without enzyme); 2-  $\alpha$ -AMI, ( $\alpha$ -amylase, kerazyme 3035, 300 ml t<sup>-1</sup> of fresh matter); 3-GLU, (glucoamylase, kerazyme 4560, 300 ml t<sup>-1</sup> of fresh matter). All silos were also inoculated with *L. plantarum* ( $4.0 \times 10^{10}$  ufc g<sup>-1</sup>) and *P. acidipropionici* ( $2.6 \times 10^{10}$  ufc g<sup>-1</sup>) added at 4 g t<sup>-1</sup> of hydrated ground corn. The silos were opened on days 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 of storage. Data were submitted to analysis of variance using the proc mixed of SAS 9.3. For fermentation losses, there was an increase in 51.33 ( $\alpha$ -ami) and 61.43% (glu) in total losses in the control. The effect of the inclusion of enzymes over time reduced to  $\alpha$ -AMI and GLU, respectively, compared to control, DM

(6.37 and 8.02%), starch (13.75 and 19.15%), NFC (1.30 and 2.00%) and IVDMD (1.42 and 2.16%), as well as increased CP (10.37 and 12.55%), EE (35.48 and 34.53%), lignin (22.29 and 33.94%) and GE (2 and 1%). During the different storage periods, the addition of enzymes increased the total fermentation losses in relation to the control, reduced DM, starch, NFC, IVDMD, and increased CP, EE, lignin and EB. Addition of enzymes reduced pH, acetate and butyrate concentration, but increased lactate concentration. The inclusion of enzyme did not increase the population of lactic acid bacteria and failed to stabilize the fungal population. The action of amylolytic enzymes on rehydrated maize silage negatively influenced fermentative losses, nutritional value and did not reflect on the BAL count, so more studies should be done to adapt the use of this technology to this type of food.

**Key-words:** digestibility, silage, starch, amylase

## 1. INTRODUÇÃO

Os carboidratos não-fibrosos, especialmente o amido, são a principal fonte de energia para ruminantes de alta produção (THEURER et al., 1999), e em sua maior parte é fornecido por grãos de cereais, principalmente pelo milho. Entretanto, a maioria dos híbridos de milho cultivados no Brasil possui alta vitreosidade (PEREIRA et al., 2004), o que torna fundamental otimizar a eficiência de utilização do amido nas dietas para maximizar a produção (PIRES et al., 2008), mas a otimização de sua digestão permanece um desafio na nutrição de ruminantes (OLIVEIRA et al., 2019).

Aplicar ao grão uma forma de processamento tem a finalidade de romper as estruturas internas aos grânulos de amido, que por consequência vai refletir sobre sua a digestibilidade. Assim, quando o grão é processado está sujeito a gelatinização (perda irreversível de sua estrutura original) (NOCEK; TAMMINGA, 1991), que compromete a integridade da matriz proteica e deixa o amido cada vez mais acessível (BARON; STEVENSON; BUCHANAN-SMITH, 1986; HOFFMAN et al., 2011).

O milho de alta umidade substitui o milho laminado a seco em dietas ruminantes devido suas características que melhoram relativamente a degradação ruminal do amido, associada à solubilização da zeína durante a fermentação da silagem (HOFFMAN et al., 2011). Essa degradação do amido é especialmente melhorada, quando os grãos de milho têm uma proporção relativamente alta de endosperma vítreo (CORREA et al., 2002; FERRARETTO et al., 2013, 2015). Entretanto, o uso do milho de alta umidade, apresenta limitações, como a disponibilidade limitada de maquinário e o excesso de chuvas durante o período de colheita (causando uma colheita atrasada e consequente

aumento no teor de MS) (BENTON et al., 2005), por isso a reidratação do milho moído se torna uma prática mais viável, especialmente no Brasil (OLIVEIRA et al., 2019).

Porém, as silagens de grão úmido são materiais mais instáveis, e no intuito de melhorar a utilização dos alimentos pelos animais, estudiosos tem se atentado cada vez mais para o uso de enzimas na nutrição animal. Neste contexto, as enzimas têm sido usadas para aumentar a degradação das paredes celulares das plantas, melhorar a fermentação e fornecer açúcares para as bactérias do ácido lático, o que aumenta coletivamente o valor nutritivo da silagem (MUCK et al., 2018).

A enzimas amilolíticas quebram a cadeia de amido na presença de água em uma reação hidrolítica. As  $\alpha$ -amilases, por exemplo, são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes na parte interna da molécula de amido, sendo o produto final de sua ação oligossacarídeos ramificados de tamanho variados e dextrinas. A sua ação sobre a cadeia de amilose ocorre de forma não seletiva sobre vários pontos da cadeia simultaneamente. Além das ligações  $\alpha$ -1,4, existem algumas  $\alpha$ -amilases que também podem hidrolisar as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 (PANDEY et al., 2005) e para que a sua atividade seja máxima e estável é necessária a presença de  $\text{Ca}^{+2}$  para a preservação da enzima na conformação ideal (SPIER, 2005).

As glucoamilases (glicoamilases; amiloglucosidase) são enzimas de ação extracelular que rompem as ligações  $\alpha$ -1,4 a partir da extremidade não redutora liberando glicose (LIN; FELBERG; CLARK, 1993). Elas também podem agir sobre as ligações  $\alpha$ -1,6 das ramificações da amilopectina, embora mais lentamente (NOROUZIAN et al., 2006). Além das frações amilose e amilopectina do amido, outras moléculas como maltose, dextrinas e glicogênio são hidrolisadas pela enzima, que atua também sobre as ligações  $\alpha$ -1,3. Segundo ZANIN (1989), a origem da glucoamilase é essencialmente fúngica (*Aspergillus* e *Rhizopus*).

A adição de enzimas amilolíticas na dieta de ruminantes podem aumentar a digestibilidade ruminal de amido e de outros carboidratos (DILorenzo et al., 2011; TRICARICO; JOHNSTON; DAWSON, 2008). Porém, no cenário da conservação de alimentos ainda são poucos os estudos sobre esses compostos e ainda é necessário definir modelos viáveis que regulem a utilização e a instabilidade de tais produtos, reduzindo os custos de sua produção e tornando seu uso mais efetivo. Então, partindo da premissa que a adição de compostos enzimáticos pode modificar positivamente as

características da silagem ao longo do tempo, o objetivo deste estudo avaliar a ação de enzimas amilolíticas na ensilagem de milho reidratado armazenadas por diferentes períodos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Este experimento foi conduzido no período de abril a dezembro de 2017, no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II.

### 2.1. Preparo da silagem

O grão de milho (híbrido DKB 330 PRO3, Dekalb, Monsanto, St. Louis, MO) usado neste experimento foi colhido durante a safra 2016/2017. Após colheita, os grãos de milho foram moídos em moinhos de facas (4 mm), reidratados, na proporção de 30 litros de água para cada 100 quilos de milho, e homogeneizados. Os silos experimentais foram feitos em tubos de polietileno de 40 cm de altura e 30 cm de diâmetro. No fundo dos silos, foi colocado areia seca (2 kg) separada da forragem por um tecido de náilon (50 mesh – porosidade) para quantificação do efluente produzido.

Cento e vinte silos experimentais foram preparados e distribuídos aleatoriamente em três tratamentos: CONTROLE (sem a adição de enzima amilolítica);  $\alpha$ -AMI (amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>); GLU (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>). Para cada tonelada de silagem confeccionada, 300 mL de enzima comercial foram utilizadas. O inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4\*10<sup>10</sup> UFC g<sup>-1</sup> + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6\*10<sup>10</sup> UFC g<sup>-1</sup> – foi adicionado a uma dose de 4 g t<sup>-1</sup> de matéria fresca em todos os tratamentos.

Antes do preparo dos silos experimentais, retirou-se uma amostra de cada silo (porção superficial, meio e inferior) que foram homogeneizadas para formar uma amostra composta e encaminhados para análise de atividade enzimática no laboratório de enzimologia, pertencente à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA-UFGD). A composição química da silagem de milho reidratado consta na Tabela 1.

## 2.2. Perdas fermentativas

A cada 30 dias de fermentação, os silos foram novamente pesados para determinação das perdas por gases e, em seguida, abertos. As perdas por gases foram calculadas de acordo com a equação a seguir:

$$PG = \frac{(PSi - PSf)}{MSE} \times 100$$

em que: PG = perda por gases (% da MS); PSi = peso do silo cheio e fechado (kg), PSf = peso do silo no momento da abertura (kg); e MSE = matéria seca ensilada (quantidade em kg  $\times$  teor de MS).

Após a retirada da silagem, o conjunto silo, areia e tecido de náilon foram pesados para quantificação do efluente produzido. A determinação da produção de efluente foi calculada pela equação:

$$PE = \frac{PSAf - PSAi}{MNE} \times 1000$$

em que: PE = produção de efluente (kg de efluente/tonelada de matéria natural ensilada); PSAf = peso do conjunto silo, areia, tela de náilon após a abertura (kg); PSAi = peso do conjunto silo, areia, tela e náilon antes da ensilagem (kg); e MNE = quantidade de forragem ensilada (kg).

A recuperação da MS (RMS) foi calculada conforme a equação:

$$RMS = \frac{MSi}{MSf} \times 100$$

em que: MS<sub>f</sub> = quantidade de MS final; MS<sub>i</sub> = quantidade de MS inicial (JOBIM et al., 2007).

## 2.3. Estabilidade aeróbia

Após a abertura dos silos, as amostras foram colocadas em baldes plásticos, pesadas e armazenadas em temperatura ambiente para avaliação da estabilidade aeróbia. A mensuração de temperatura no interior das silagens (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 e 120 horas) foi feita com termômetro digital de infravermelho. Também foram registradas a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar atrás de termo-higrômetro digital. A estabilidade aeróbia foi

calculada como o tempo gasto, em horas, para a massa de forragem elevar em 1°C em relação à temperatura do ambiente (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; VAN WIKSELAAR, 2001). A determinação do pH das silagens foi feita com uso de potenciômetro nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas (KUNG JR et al., 1984). Para a MS retirava-se  $\pm 100$ g do material ensilado nas horas 0, 24, 48, 72, 96 e 120 que posteriormente foram colocados em estufa a 105° por 24 horas (método 950.15; AOAC, 2000). As perdas na massa ensilada foram calculadas pela diferença no conteúdo de MS inicial e final dos silos, em relação à quantidade de MS da forragem ensilada, conforme equação descrita por Jobim et al., (2007).

#### **2.4. Valor nutricional**

Após abertura dos silos, amostras compostas foram levadas para pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 55° C por 72h e após este período foram moídas em moinho do tipo Willey a 1 mm, e secas por 8h em estufa a 105° C para determinar a matéria seca (MS, método 950.15), cinza (método 942.05), matéria orgânica (MO, 1000-cinzas), proteína bruta (PB,  $N \times 6.25$ , método Kjeldahl 984.13) extrato de etéreo (EE, método 920.39), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método 973.18), (AOAC, 2000). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest; Robertson; Lewis (1991) e o teor de amido conforme metodologia descrita por Hendrix (1993). As concentrações em carboidratos não-fibrosos (CNF) foram obtidas a partir da equação:  $CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%cinzas + \%FDN)$ .

Amostras de cada silo foram utilizadas para realizar a digestibilidade in vitro da MS segundo metodologia de Tilley; Terry (1963) modificada por Holden (1999), onde aproximadamente 0,5 g de amostra foram pesados em sacos de filtro Ankom F57, Ankon®, em triplicata. O fluido ruminal foi amostrado manualmente a partir de 2 bovinos machos canulados no rúmen, pouco antes da alimentação matinal. Após amostragem, o inóculo foi coado e enviado para o laboratório em garrafas térmicas. No equipamento juntamente com as amostras, sacolas vazias foram utilizadas como controle. A energia bruta foi obtida através de bomba calorimétrica. Os valores de energia foram calculados da seguinte forma:  $Energia\ digestivel\ (Mcal.kg^{-1}) = Energia\ bruta\ (EB) \times DIVMO$ . A energia metabolizável foi calculada pela formula:

$EM (Mcal. kg^{-1}) = 1,01 \times ED - 0,45$ . A energia líquida para lactação foi calculada pela fórmula  $ELL = 0,0245 \times NDT(\%) - 0,12$ . O NDT foi obtido pela fórmula  $NDT (\%) = dCNF + dPB + (dEE \times 2,25) + dFDN$ , em que “d” representa a digestibilidade aparente dos diferentes componentes (NRC, 2001).

### **2.5. Perfil fermentativo**

Após a abertura dos silos, a silagem foi homogeneizada e uma amostra (200 g) de cada silo experimental foi coletada para através de pressão fazer a extração do suco da silagem. Para mensuração do pH 10 g de amostras foram homogeneizadas em 50 mL de água destilada e deixada em repouso por 30 minutos. A leitura foi feita com potenciômetro digital (MB-10, Marte, Santa Rita do Sapucaí, Brasil). Para análise dos ácidos orgânicos foi utilizada metodologia de Erwin et al. (1961). Quanto ao nitrogênio amoniacal, a análise foi feita por meio de um método colorimétrico como descrito por Kulasek (1972) e adaptado por Foldager (1977). As análises de ácidos graxos de cadeia curta, etanol e ácido láctico foram realizadas no Departamento de Química na Universidade Federal de São Carlos, Campus Araras, segundo os métodos descritos por Rodrigues et al. (2012). A concentração láctica foi avaliada por cromatografia líquida de alta performance (sistema HPLC LC-10ADVP Shimadzu, Shimadzu Inc., Kyoto, Japão), como descrita por Ding et al. (1995).

### **2.6. Análise microbiológica**

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Silva et al., (1997), com adaptações. As amostras de silagem de milho reidratadas (10 g) foram diluídas em solução de cloreto de sódio esterilizada (9 g / l, 90 ml). A partir desta suspensão bacteriana, foi obtida a diluição de  $10^{-2}$ , retirando uma alíquota de 1 mL e adicionando em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) e homogeneizado em VORTEX. O processo foi repetido até a diluição de  $10^{-6}$ .

A contagem de microrganismos foi realizada em triplicata através de diluições decimais em placas de Petri. Para as bactérias do ácido láctico foi utilizado o método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) no meio de cultura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 48 horas. Para análise de bactérias aeróbias, foi utilizado o método de plaqueamento em gotas (*drop plate*) e para

as anaeróbias facultativas o método utilizado foi de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) no meio de cultura PCA (Plate Count Ágar). As placas foram incubadas em estufa a 34 °C por 48 horas, para os microrganismos aeróbicos e a 37° C por 48 horas, para os microrganismos anaeróbicos facultativos. Para fungos totais, foi feito plaqueamento em superfície (*spread plate*) no meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), e as placas foram incubadas em estufa a 26° C por 120 horas.

Após o tempo de incubação, realizou-se a contagem dos microrganismos. Considerando apenas as placas que apresentaram contagem entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias. Realizou-se a média aritmética. Os valores absolutos foram obtidos a partir de UFC e depois transformados em log. Todas as análises acima citadas, foram realizadas no primeiro dia de abertura dos silos.

### ***2.7. Análise enzimática***

A análise da atividade enzimática foi realizada em nove tempos diferentes. Cada tempo de análise representa a quantidade em dias em que o material estava ensilado, indo de 0 a 240 dias, sendo t0 o momento do fechamento dos silos.

A determinação da atividade enzimática e a quantificação de açúcar redutor total foi realizada segundo modelo de Miller (1959) com adaptações. Para avaliação da atividade enzimática, as amostras (5 g) foram constantemente agitadas a 1000 rpm por 1 h, com água destilada (50 mL).

Para quantificar a atividade enzimática, 5 g de amido de milho foi pesado, com auxílio de uma proveta, adicionou-se 50 mL de tampão acetato de sódio que foi aquecido em micro-ondas. Transferiu-se 900 µL da solução de amido para tubos de ensaio, que foram colocados em banho-maria por 3 minutos a 50°C. Ainda no banho-maria, adicionou-se 100 µL da solução enzimática diluída (5x e 10x), passados 10 minutos, adicionou-se 1 mL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) e os tubos foram transferidos para o banho de ebulição por 10 minutos a 80°C. Assim que os tubos foram retirados do banho de ebulição eles foram colocados em banho gelado por ± 3 minutos, após, adicionou-se 8 mL de água destilada para então realizar a leitura de glicose em espectrofotômetro a 540 nm.

Para a quantificação do açúcar redutor, foi adicionado 40 mL de água destilada em 5 g de silagem proveniente dos diferentes tratamentos. Após adição da água as

amostras foram mantidas em agitação por 1 hora a 100 rpm a 25°C. Posteriormente, todo conteúdo foi filtrado em tecido sintético (nylon) e centrifugado a 1500 x g por 5 min. O sobrenadante foi utilizado para determinação de açúcar redutor. A quantificação de açúcar redutor total foi realizada utilizando ácido 3,5-ácido dinitrosalisílico (DNS). Em cada tubo foram adicionados 1 mL de amostra e 1 mL de DNS. A referida mistura foi mantida a 100°C por 10 minutos. Em seguida foram resfriados em banho de gelo, adicionado 8 mL de água destilada e levados para leitura em espectrofotômetro a 540nm. O açúcar redutor foi calculado a partir de uma curva de calibração utilizando glicose como padrão. Os ensaios foram realizados em “duplicatas” e os resultados representam suas respectivas médias.

### **2.8. Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o PROC MIXED (versão 9.3, SAS Institute, Cary, NC), de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + E_i + T_j + E_i \times T_j + e_{ijk}$$

Com  $e_{ijk} \approx N(0, \sigma_i^2)$ ; onde  $Y_{ijk}$  é o valor da variável dependente;  $\mu$  é a média geral;  $E_i$  é o efeito fixo da enzima;  $T_j$  é o efeito fixo do tempo (abertura dos silos);  $E_i \times T_j$  é um termo de interação;  $e_{ijk}$  é o erro residual; N representa distribuição gaussiana e  $\sigma_i^2$  é a variância associada a cada tratamento. Os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Rogers (1997).

O efeito dos tratamentos foi decomposto em dois contrastes ortogonais: (1) os 2 tratamentos enzimáticos versus o controle; e (2)  $\alpha$ -AMI vs GLU. Outras comparações foram feitas usando LSD protegido por Fisher. O nível de significância foi estabelecido em  $P \leq 0,05$  e tendência entre 0,051 a 0,10.

## **3 RESULTADOS**

### **3.1. Perdas fermentativas**

Com exceção ( $P = 0,664$ ) das perdas por gases, expressas na matéria natural, houve interação entre os efeitos de enzimas e tempo de armazenamento ( $P \leq 0,050$ ) para todas as variáveis relacionadas às perdas fermentativas (Tabela 5). De maneira geral, as enzimas amilolíticas aumentaram ( $P < 0,001$ ) as perdas por gases, efluentes e

totais da silagem. Comparando as duas enzimas, GLU tendeu a aumentar ( $P = 0.069$ ) as perdas totais, em relação à  $\alpha$ -AMI.

Para as perdas por gases, foi observado nas avaliações realizadas 30 e 60 dias após a ensilagem, que GLU aumentou ( $P \leq 0,05$ ) as perdas em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). A partir de 90 dias de ensilagem, as enzimas aumentaram ( $P \leq 0,05$ ) as perdas por gases, em relação a CON. Ademais,  $\alpha$ -AMI apresentou ( $P \leq 0,05$ ) maiores perdas por gases que GLU, nas avaliações realizadas aos 150 e 180 dias após a ensilagem, não diferindo ( $P > 0,05$ ) nos demais tempos de avaliação (Figura 2).

Para as perdas totais, foi observado nas avaliações feitas 30 e 60 dias após a ensilagem, que GLU aumentou ( $P \leq 0,05$ ) as perdas em relação aos demais tratamentos. Aos 90 dias de ensilagem, as enzimas não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ) e praticamente não mudaram ao longo do período experimental, exceto aos 150 dias quando  $\alpha$ -AMI apresentou ( $P \leq 0,05$ ) maiores perdas totais que GLU. Entre os 60 e 210 dias de ensilagem o controle apresentou as menores médias, mas aos 240 dias as médias de todos os tratamentos foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ) (Figura 3).

De acordo com a equação de regressão polinomial simples  $y=102,78+0,91x-0,005x^2$ ;  $r^2=0,19$ , o tempo ideal de utilização do silo, de acordo com as perdas totais, seria até 91 dias (Figura 4).

### ***3.2. Estabilidade aeróbia***

A inclusão de enzimas influenciou a estabilidade aeróbica. A concentração de MS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) das massas ensiladas no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de abertura foi influenciada pela enzima ( $P = <0,0001$ ), tempo ( $P = <0,0001$ ) e interação ( $P = <0,0001$ ), e quando o efeito dos tratamentos foi decomposto, a concentração de MS foi significativo para o C1 ( $P = <0,0001$ ; Figura 5). Aos 30 dias de ensilagem  $\alpha$ -AMI apresentou a menor média ( $P \leq 0,05$ ) e o tratamento CON e GLU não apresentarem diferença ( $P > 0,05$ ). Aos 60 dias de ensilagem, os três tratamentos foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ), e a partir deste período até o final das observações o CON foi o tratamento que apresentou as maiores médias ( $P \leq 0,05$ ) para a concentração de MS.  $\alpha$ -AMI e GLU apresentaram médias estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ) aos 90, 150 e 240 dias de ensilagem.

Os valores de pH no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais (Figura 6), também foram influenciados pelas enzimas, pelo tempo e pela interação ( $P = <0,0001$ ) e foi significativo para o C1 ( $P = <0,0001$ ). Dos 30 para os 60 dias foi verificada uma queda nos valores desta variável para os três tratamentos, sendo estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ). Contudo, a partir dos 60 dias de ensilagem o CON manteve as medias mais altas ( $P \leq 0,05$ ) e GLU e  $\alpha$ -AMI não diferiram mais entre si ( $P > 0,05$ ) ao longo do período experimental.

A variação da temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais (Figura 7) foi significativa para efeito de tempo e de interação ( $P = <,0001$ ), tendo sido maior no CON ( $P \leq 0,05$ ) aos 30 e 60 dias após a ensilagem, e após os 60 dias de ensilagem não diferiu mais entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ). Aos 30 a diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura ambiente para o tratamento CON foi de  $5,05^{\circ}\text{C}$  e GLU apresentou  $\Delta t$  superior a  $\alpha$ -AMI ( $3,35^{\circ}\text{C}$  contra  $1,42^{\circ}\text{C}$ ). Aos 60 dias, o  $\Delta t$  do CON foi de  $1,66^{\circ}\text{C}$ .

O teor de MS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais foi influenciado pelas enzimas, tempo e interação ( $P = <0,0001$ ;Figura 8) e foi significativo também para o C1 ( $P = <0,0001$ ). Da primeira à última hora o teor de MS foi maior no tratamento CON ( $P \leq 0,05$ ) e não diferiu entre os dois tipos enzimáticos ( $P > 0,05$ ), e foi aumentando ao longo do das 120 horas de coleta (Figura 9). A concentração de pH no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais demonstrou o mesmo comportamento observado para MS, ou seja, não diferiu entre as enzimas ( $P > 0,05$ ) e foi superior no tratamento CON ( $P \leq 0,05$ ), apresentando aumento a medida que o tempo passava.

Para as mudanças na temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) ao longo das horas de coleta, não houve efeito significativo das variáveis analisadas ( $P > 0,05$ ), porém estabelecendo o limite de até  $2^{\circ}\text{C}$  de diferença entre a temperatura da silagem e a temperatura do ambiente,  $\alpha$ -AMI manteve a temperatura do silo dentro da normalidade por maiores períodos, seguida pela GLU e CON (Figura 10).

### 3.3. Valor nutricional

Os silos tratados com enzimas apresentaram maiores ( $P \leq 0,021$ ) teores de PB, EE, lignina e EB e menores de MS e amido do que os silos do tratamento CON (Tabela 6). Com exceção da lignina ( $P = 0,393$ ) houve efeito do tempo para todas as variáveis relacionadas ao valor nutricional. Não houve interação ( $P \geq 0,304$ ) entre os efeitos de enzimas e tempo de armazenamento para CNF, FDN, FDA, NDT e para os tipos de energia calculas. Comparando  $\alpha$ -AMI + GLU ao controle, a inclusão de enzima diminuiu ( $P \leq 0,05$ ) os teores de MS, amido, CNF e a DIV e aumentou a PB, o EE, a lignina e a EB. Comparando as duas enzimas, GLU teve maior redução ( $P \leq 0,028$ ) de MS e amido.

Para a MS, foi observado nas avaliações realizadas 30 e 60 dias após a ensilagem, que  $\alpha$ -AMI diminuiu ( $P \leq 0,05$ ) a MS em relação aos demais tratamentos, que não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). A partir de 90 dias de ensilagem, o tratamento CON manteve as maiores médias ( $P \leq 0,05$ ). Nas avaliações realizadas aos 90, 120, 210 e 240 dias após a ensilagem  $\alpha$ -AMI e GLU não diferiram ( $P > 0,05$ ), porém aos 150 e 180 dias  $\alpha$ -AMI aumentou a MS em relação a GLU (Figura 11).

Para o amido, foi observado aos 30 dias de ensilagem médias diferentes ( $P < 0,05$ ) para os três tratamentos. Dos 60 aos 240 dias após a ensilagem, o tratamento CON aumentou ( $P \leq 0,05$ ) o teor de amido com exceção dos 120 dias, quando CON e  $\alpha$ -AMI que não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). Aos 60 dias GLU e  $\alpha$ -AMI apresentaram médias estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ). Entre os tempos 150 a 210  $\alpha$ -AMI foi o tratamento com as menores ( $P \leq 0,05$ ) médias (Figura 12).

De acordo com a equação de regressão polinomial simples  $y=924,08+0,685x-0,004x^2$ ;  $r^2=0,33$ , levando em consideração a digestibilidade in vitro, o tempo ideal de utilização do silo seria até 86 dias (Figura 13).

### 3.4. Perfil Fermentativo

Os silos tratados com enzimas apresentaram menores ( $P \leq 0,046$ ; Tabela 7) concentrações de pH, N-NH<sub>3</sub>, acetato, propionato, butirato e totais e aumentou o etanol, lactato e o isobutirato. Com exceção do N-NH<sub>3</sub> houve efeito do tempo ( $P = 0,438$ ) e da interação ( $P = 0,128$ ) para todas as variáveis relacionadas ao perfil fermentativo. Comparando os dois tipos enzimáticos ao controle, a inclusão de enzima diminuiu ( $P \leq$

0,013) o pH, N-NH<sub>3</sub>, acetato, propionato, butirato e os totais e aumentou o etanol, lactato e o isobutirato. Comparando as enzimas,  $\alpha$ -AMI tendeu a reduzir ( $P \leq 0,098$ ) o acetato, propionato e totais.

Aos 60 dias, o pH de todos os tratamentos foi estatisticamente igual ( $P > 0,05$ ), mas a partir deste período, o tratamento CON se manteve acima de 4 até o final do período experimental, e  $\alpha$ -AMI e GLU não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre si (Figura 14).

Para o etanol, nas avaliações realizadas entre 30 e 150 dias após a ensilagem os três tratamentos diferiram entre si ( $P < 0,05$ ), com o CON apresentando as menores e  $\alpha$ -AMI as maiores médias até os 120 dias de avaliação. A partir dos 150 dias, GLU apresentou médias superiores ( $P \leq 0,05$ ), mas aos 210 não diferiu ( $P > 0,05$ ) do tratamento  $\alpha$ -AMI. Aos 180 e 240 dias  $\alpha$ -AMI e CON apresentaram medias estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ) (Figura 15).

Até os 60 dias, a concentração de lactato se manteve estatisticamente igual ( $P > 0,05$ ) nos três tratamentos. Aos 90 dias de ensilagem,  $\alpha$ -AMI teve a maior média ( $P \leq 0,05$ ) e CON e GLU não diferiram ( $P > 0,05$ ). Aos 120, 150 e 210 dias após a ensilagem, o CON apresentou a menor ( $P \leq 0,05$ ) concentração de lactato e  $\alpha$ -AMI e GLU não diferiram ( $P > 0,05$ ). Na avaliação feita aos 180 dias de ensilagem, todos os tratamentos apresentaram médias diferentes ( $P \leq 0,05$ ), e ao final do período experimental,  $\alpha$ -AMI foi o tratamento com a maior média ( $P \leq 0,05$ ) (Figura 16).

Até os 60 dias, a concentração de acetato foi estatisticamente igual nos três tratamentos ( $P > 0,05$ ), e a partir deste período CON manteve as maiores médias até o final do período experimental. Aos 90 e 120 dias,  $\alpha$ -AMI e GLU tiveram médias iguais ( $P > 0,05$ ). Porém, nas avaliações feitas aos 150, 180 e 210 dias GLU apresentou as maiores médias ( $P \leq 0,05$ ), e aos 240 as médias dos três tratamentos foram diferentes ( $P \leq 0,05$ ) com GLU apresentando a menor média (Figura 17).

O propionato manteve médias iguais ( $P > 0,05$ ) nos três tratamentos até os 90 dias. Nas avaliações feitas aos 120, 150, 210 e 240 dias o CON apresentou as maiores médias ( $P \leq 0,05$ ) e  $\alpha$ -AMI e GLU não diferiram entre si ( $P > 0,05$ ). Aos 180 dias, a concentração de propionato não diferiu ( $P > 0,05$ ) entre o CON e  $\alpha$ -AMI e aos 240 dias não diferiu entre  $\alpha$ -AMI e GLU (Figura 18).

### **3.5. Microbiologia**

As contagens de BAL, anaeróbias, aeróbias e fungos e bolores das silagens foram influenciadas pela adição de enzimas, tempo, observando-se efeito de interação ( $P = <,0001$ ; Tabela 7). De maneira geral, as enzimas amilolíticas diminuíram ( $P = < 0,001$ ) a contagem de todos os microrganismos avaliados. Comparando as duas enzimas,  $\alpha$ -AMI aumentou ( $P = <,0001$ ) BAL, anaeróbias e fungo, e reduziu aeróbicas em relação à GLU.

Aos 30 dias de avaliação, GLU apresentou menor ( $P \leq 0,05$ ) média para BAL, e CON e  $\alpha$ -AMI não diferiram ( $P > 0,05$ ). Aos 60 e 120 dias, todos os tratamentos diferiram ( $P \leq 0,05$ ) com o CON apresentando as maiores médias. A partir dos 150 dias,  $\alpha$ -AMI e GLU não diferiram ( $P > 0,05$ ) e a contagem desses tratamentos ficando abaixo do CON (Figura 19).

O crescimento dos fungos e bolores sofreu intensas modificações ao longo do tempo. Aos 30 dias foi igual ( $P > 0,05$ ) em todos os tratamentos. Aos 60 e 90 dias, CON e  $\alpha$ -AMI não diferiram ( $P > 0,05$ ), e entre os dias 120 e 150  $\alpha$ -AMI e GLU apresentaram médias estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ). Aos 180 dias  $\alpha$ -AMI apresentou um pico ( $P \leq 0,05$ ) na média para os fungos (Figura 20).

### **3.6. Atividade enzimática**

A atividade amilolítica efeito das enzimas e do tempo, e foi significativa para os dois contrastes ( $P = <.0001$ ; Figura 21). Comparando as enzimas,  $\alpha$ -AMI apresentou os maiores índices de atividade, apresentando um comportamento sempre crescente ao longo de todo o período. Esse fato justifica a presença superior de açúcar redutor nos silos tratados com  $\alpha$ -AMI, que foi significativo para os efeitos de enzima, tempo e para os dois contrastes ( $P = <.0001$ ; Figura 22).

## **4. DISCUSSÃO**

### **4.1. Perdas fermentativas**

Teoricamente, a adição da enzima deve estimular a quebra dos carboidratos mais complexos para que estes possam ser utilizados pelos microrganismos, promovendo maior ação sobre a matriz proteica dos grãos de milho e também uma maior e mais

rápida produção de ácido láctico (Tabela 7), liberando açúcares solúveis prontamente disponíveis para fermentação. Entretanto, neste trabalho, ao longo do tempo de armazenamento todos os silos que receberam as enzimas amilolíticas apresentaram redução na recuperação da MS e aumento nas perdas fermentativas.

Oliveira et al (2019) ao avaliarem os efeitos da incorporação de enzimas amilolíticas sobre as perdas fermentativas na silagem de milho reidratado observaram que a inclusão das enzimas aumentou a produção de gás, efluente e as perdas totais da silagem, e diminuiu a recuperação da MS, concordando com os dados obtidos neste trabalho. Lopes (2016) ao avaliar o efeito de enzimas sobre as perdas na MS da silagem de grão de milho reidratado encontrou que cerca de 60% das perdas em silos experimentais de tubo de plástico armazenados por 81 dias, ocorreu pela maior produção de efluentes e degradação aeróbia da MS durante o estágio inicial da ensilagem.

Além disso, maiores perdas podem estar relacionadas a seletividade nas populações microbianas, feita pela combinação do inoculante com as enzimas ao longo do tempo. Neste estudo, as enzimas aumentaram a concentração de ácido láctico (Tabela 7), o que pode ter ocasionado a seleção de microrganismos no silo, com consequente aumento da proteólise da zeína. A degradação da zeína durante a fermentação da silagem está associada a atividade microbiana e a produção de ácidos orgânicos (HOFFMAN et al., 2011; JUNGES et al., 2017), e quanto maior for a presença de carboidratos fermentáveis no silo (silagem de milho moído, silagem de cana-de-açúcar e silagem de milho reidratado), maior será a atividade microbiana e maiores serão as perdas fermentativas (PEDROSO et al., 2005). Dependendo das vias fermentativas dos microrganismos e dos compostos formados a partir delas, as perdas podem ser influenciadas. Vias heterofermentativas têm como um dos produtos finais da fermentação de açúcares a produção  $\text{CO}_2$ , que conseqüentemente levo ao aumento das perdas (DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; SPOELSTRA, 1999; DRIEHUIS; OUDE ELFERINK; VAN WIKSELAAR, 2001).

Outro fator que contribui para o aumento das perdas, foi o teor de umidade. Senger et al. (2005) comprovaram este aspecto ao avaliarem silagens de milho com diferentes níveis de umidade e constatando uma maior produção de efluente onde o teor de umidade era maior. Dessa forma, silagens produzidas com maior teor de umidade são

susceptíveis à compactação (RABELO et al., 2012), que combinada a inclusão da enzima levou ao rompimento da membrana das células e ao vazamento do conteúdo celular, resultando em perdas substanciais de nutrientes.

#### **4.2. Estabilidade aeróbia**

A deterioração aeróbia está associada com diminuição dos carboidratos solúveis e ácido láctico; aumento do pH, do número de leveduras e fungos filamentosos (WEINBERG et al., 1993) e da temperatura (PAHLOW et al., 2003).

Oliveira et al. (2019) observaram, ao avaliarem os efeitos da incorporação de enzimas amilolíticas a silagem de milho reidratado, que após a exposição aeróbia as silagens tratadas com  $\alpha$ -amilase apresentaram maior teor de MS em relação ao tratamento controle. Dados que não concordam com os valores encontrados no presente estudo, em que o tratamento controle foi o que manteve o maior teor de MS ao longo do tempo Figura 5.

Morais et al. (2012) ao inocularem silagem de grão úmido de milho com *Lactobacillus plantarum* mesófilo, *Lactobacillus plantarum* termófilo, *Pediococcus* acidófilo e *Propionibacterium* acidófilo (100bilhões UFC.g<sup>-1</sup>), 25% de glicose e 50% de enzimas amilolítica, não encontraram diferença entre os tratamentos. Porém, as enzimas amilolíticas em nosso trabalho foram adicionadas em uma proporção maior a utilizada pelos autores, 300 mL.T<sup>-1</sup>, e este fato aliado ao processo de reidratação do milho pode ter ocasionado a redução da MS ao longo do período em que a silagem foi exposta novamente ao oxigênio (Figura 5).

Com relação ao pH, o uso das enzimas foi efetivo no controle deste parâmetro, deixando-o dentro dos parâmetros desejáveis, 3,8 – 4,2 (McDonald et al., 1991). Oliveira et al (2019) verificaram que após 48h de exposição aeróbica o tratamento controle apresentou os maiores valores de pH até o final do período de avaliação. Quando Ferraretto; Fredin; Shaver, (2015) combinaram a inoculação microbiana a ensilagem eles encontraram um menor valor de pH (3,99 vs. 4,40 em média) devido a maiores concentrações de ácido láctico, do mesmo podemos associar os níveis de pH a concentração de lactato no presente estudo (Tabela 7). Kung Jr, (2001) afirma que a variação do pH durante o período de exposição ao ar pode ser um indicativo prático de

que a silagem está sendo deteriorada devido ao contato com o ar e o uso de inoculantes bacterianos ou enzimáticos reduz a susceptibilidade à deterioração.

Com relação a  $\Delta t$  Driehuis; Oude Elferink; Van Wikselaar (2001) estabeleceram que a quebra da estabilidade aeróbia é definida como o tempo que a temperatura da silagem exposta ao ar demora a atingir 1°C acima da temperatura do ambiente. Já Kung Jr et al. (2003) consideram que a quebra da estabilidade ocorre quando há o aumento de 2°C acima da temperatura do ambiente. De todo modo, esse aumento é causado devido ao crescimento de leveduras e fungos filamentosos no silo (WOOLFORD, 1990). Quando a massa ensilada foi exposta novamente ao O<sub>2</sub> essas populações que estavam adormecidas encontraram facilidade para voltar a se desenvolver. Weinberg et al. (2011) salientam que as leveduras são os microrganismos mais relacionados à deterioração das silagens, quando expostas ao O<sub>2</sub>, o que deprecia consideravelmente o valor nutritivo do alimento e contribui para o decréscimo da sua digestibilidade. E além desse fator, o aumento da temperatura pode se dar em virtude do balanço entre a taxa de calor produzida pela atividade microbiana e as perdas de calor, o que está diretamente relacionado à oxidação da MS, que provoca perdas na forma de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (HILL; LEAVER, 2002).

A associação das mudanças na temperatura, quantidade de MS e na concentração do pH estão intimamente relacionados a seleção de microrganismos ao longo do tempo em consequência a adição das enzimas. Em determinados períodos, o incremento na MS pode ter sido resultado da alta fermentação homolática, que disponibilizou substratos – ácido láctico – ao desenvolvimento, principalmente, das leveduras (MUCK, 2010) e, em um segundo momento, dos fungos filamentosos, que ao consumir o produto da fermentação, além de CHOs solúveis residuais, ocasionou o aquecimento da massa devido ao processo de respiração desses microrganismos (RABELO et al., 2012) e conseqüentemente, modificou o pH. A qualidade da silagem e a estabilidade são aspectos inversamente proporcionais, assim quanto maior for a estabilidade, menor será a qualidade das silagens (SANTOS et al. 2010).

#### ***4.3. Valor nutricional***

Na avaliação do valor nutricional das silagens, o controle apresentou maior teor de MS (585,35 g kg<sup>-1</sup>), seguida pela silagem com  $\alpha$ -AMI (550,28 g kg<sup>-1</sup>) e silagem com

GLU (541,89 g kg<sup>-1</sup>). Morais et al. (2012) não encontraram efeito significativo sobre o teor de MS quando utilizaram o aditivo enzimático bacteriano. Ferraretto; Fredin; Shaver (2015) encontraram teor de MS maior no tratamento de grão de milho seco do que nos tratamentos em que os grãos foram reidratados ou reidratados e ensilados (P = 0.001). Já Kung Jr et al. (2007) ao avaliar a inoculação com *L. buchneri* ( $6,6 \times 10^5$  UFC.g<sup>-1</sup>), mistura de enzimas –  $\beta$ -glucanase (EC 3.2.1.78),  $\alpha$ -amilase (EC 3.2.1.1) e xilanase (EC 3.2.1.8) – associação de LB com ENZ ou a adição de um inibidor de bolor líquido a 0,1% (LMI), verificaram diferença significativa nos teores de MS entre a silagem de grãos úmidos com relação ao controle, mas não consideraram este resultado biologicamente significativo.

Oliveira et al. (2019) observaram que a adição de enzima amilolíticas sobre a silagem de milho reidratado aumentou o teor de MS na silagem. Lopes (2016) verificou que em relação ao controle a adição de  $\alpha$ -amilase induziu a um pequeno aumento no teor de MS (+0,4% unidades) enquanto glucoamilase reduziu a MS (-1,8% unidades). No presente estudo, independentemente do tipo enzimático adicionado a massa ensilada, ocorreu redução do teor de MS (6,37 e 8,02%,  $\alpha$ -AMI e GLU respectivamente). A diferença no teor de MS provavelmente está relacionada à perda de MS durante a respiração aeróbia ou a fase de fermentação (MCDONALD et al., 1991). A adição de amilases a silagem de grão de milho reidratado em uma proporção superior (300 mL.T<sup>-1</sup>) também pode ter contribuído, ao longo do período de armazenamento, com as modificações a MS, já que aumentaram a diluição e homogeneização dos nutrientes no silo, modificaram o processo fermentativo da silagem e reduziram o teor de MS, devido à produção da “água de metabolismo” (RODRIGUES et al., 2002).

Para a PB, menor teor foi observado no controle, e valores significativos foram encontrados tanto para a adição de enzimas quanto para o tempo, não diferindo entre os silos tratados com enzimas. Lopes (2016) avaliando amilases de diferentes origens fúngicas encontrou valores numericamente superiores para as silagens de grão de milho reidratado em relação ao controle (de 10,5% no controle para 10,7 e 10,8% nas silagens tratadas) e ao comparar silagens não tratadas com enzimas glucoamilase, protease e fibrolítica achou maior teor de PB para a enzima glucoamilase. Ferraretto; Fredin; Shaver (2015) observaram uma tendência de a PB ser maior no tratamento que o milho seco foi reidratado e ensilado em relação ao milho de alta umidade.

Neste caso, a inclusão de  $\alpha$ -AMI e GLU levaram ao incremento da PB em 10,37 e 12,55% quando confrontada as médias dos tratamentos ao controle. O que pode ter ocorrido, da interação entre o uso da enzima e o tempo de armazenamento, é que a solubilidade da proteína tenha sido alterada, levando ao aumento de seu teor. Dessa forma, o consumo dos carboidratos solúveis elevou a concentração de PB nos silos tratados.

Para o teor de amido, comparando a inclusão das enzimas com o controle, ocorreu uma redução do valor, em 13,75 e 19,15% para  $\alpha$ -AMI e GLU, respectivamente, concordando com os dados de Chen et al. (1995), que relataram menor teor de amido mesmo quando a MS, MO, PB e FDN foram superiores quando o grão foi tratado com enzimas amilolíticas. Lopes (2016) encontrou acentuada redução na concentração de amido induzida pela enzima glucoamilase (-7,4% unidades). As zeínas são intensamente hidrofóbicas e insolúveis em água e líquido ruminal, mas são solúveis em ácido láctico e ácido acético (LAWTON, 2002). Deste modo, como a fermentação da silagem produz ácido láctico e acético, as zeínas que formam a matriz amido-proteína foram solubilizadas e, adicionalmente, a proteólise é também um mecanismo intrínseco da fermentação, o que resulta em degradação de proteínas do endosperma (BARON; STEVENSON; BUCHANAN-SMITH, 1986). Tais processos, característicos da fermentação, podem ser considerados fatores de aumento da exposição do amido a ação das enzimas.

Assim, a redução do amido é explicada pelo processo de ensilagem e também pela presença de enzimas que, por serem capazes de hidrolisar os componentes da parede celular, aumentaram o substrato disponível para a fermentação láctica. E o amido, durante a fermentação, também pode sofrer alterações promovidas pela acidificação, podendo apresentar maior degradação, formando glicose (CHEN; STOKES; WALLACE, 1994; KUNG JR et al., 1993). A redução deste componente, está intimamente relacionada à atividade enzimática, que deixou este componente mais exposto para ser utilizado nas etapas de fermentação no silo.

Oliveira et al. (2019) observaram que a adição de enzima aumentou a digestibilidade *in vitro* da MS. Por sua vez, Rodrigues et al. (2002) encontraram redução da DIVMS quando fizeram o uso do inoculante que continha em sua composição amilase. Chen et al. (1995) ao adicionarem um complexo enzimático derivado de fungos

com atividades amilolíticas e proteolíticas a grãos de sorgo (floculados ou laminado a seco) na dieta de vacas em lactação constataram que a digestibilidade da MS, MO, PB e FDN foi aumentada por essas enzimas, embora o tratamento não tenha afetado a produção de leite ou o consumo de MS. Em contraste, as enzimas amilase não afetaram a digestibilidade dos nutrientes no trato total nos estudos de Tricarico et al. (2005) e Hristov et al. (2008). Não existe uma conformidade nos resultados sobre a inclusão de amilases exógenas, sabe-se que elas têm o potencial de aumentar a ingestão e melhorar a produção de leite, mas o mecanismo exato de como isso ocorre ainda é desconhecido (KLINGERMAN et al. (2009).

#### **4.4. Perfil fermentativo**

Os menores valores de pH dos silos tratados podem ser explicados devido ao menor teor de MS, uma vez que silagens com maior teor de MS, como o CON, tendem a estabilizar o processo fermentativo em pH mais elevado, devido a menor produção de ácidos em função do aumento na pressão osmótica (MCDONALD et al., 1991). Moraes et al. (2012), utilizando o inoculante microbiano composto por *Lactobacillus plantarum* mesófilo, *Lactobacillus plantarum* termófilo, *Pediococcus acidófilo* e *Propionibacterium acidófilo* (100bilhões UFC/g), mais 25% de glicose e 50% de enzimas amilolíticas em silagem de grão úmido de milho, encontraram redução no pH ao comparar os silos tratados ao controle. Andrade (2013), ao avaliar a silagem de milho reidratado com soro de leite e inoculada com *Enterococcus faecium* e *Lactobacillus plantarum* ( $1,0 \times 10^{10}$  UFC.g<sup>-1</sup>); *Pediococcus acidilactici* ( $1,0 \times 10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>) e enzimas amilolíticas (1,5%), celulolíticas (1,5%) e proteolíticas (2,0%), observou que os valores de pH reduziram, em decorrência da combinação do inoculante com a reidratação feita com soro de leite, o que foi associado ao aumento da disponibilidade de substrato para o crescimento de BAL, resultando em maior produção de ácidos orgânicos (principalmente ácido lático). Da mesma forma, neste trabalho as enzimas atuaram modificando as vias de fermentação, favorecendo a produção de lactato e reduzindo os valores de pH das silagens tratadas em relação ao controle.

Encontrou-se um aumento com relação a concentração de etanol na proporção de 320 e 327% para  $\alpha$ -AMI e GLU, respectivamente, em relação ao controle (5,49 para 23,07 e 23,44) nas silagens tratadas. Ferraretto; Fredin; Shaver (2015) encontraram

concentrações de etanol reduzidas com inoculação microbiana associada a reidratação e ensilagem. No geral, a inoculação com bactérias produtoras de lactato reduz o pH e desloca a fermentação para ácidos lácticos em vez de ácidos acético e propiônico em diversos alimentos ensilados, mas as respostas podem ser variáveis (MUCK, 2010). Rodrigues et al. (2002) mesmo não achando alteração para a concentração do ácido acético, propiônico, butírico e láctico, bem como o pH ou a concentração do nitrogênio amoniacal nas silagens tratadas com inoculante + enzima, encontraram incremento nos níveis de etanol em seu estudo de 1,23 unidades percentuais. O que pode ter acontecido, nos dois casos, é que o inoculante + enzimas pode ter causado a rápida acidificação e assim favoreceu o desenvolvimento de leveduras não sensíveis ao baixo pH e levou, portanto, a fermentação de açúcares residuais a etanol, dificultando a interpretação de resultados experimentais (CHAMBERLAIN, 1987). O alto teor de etanol pode estar ligado à intensa atividade de leveduras, que é mais crítica em silagens com altos teores de açúcares, como a de grão úmido, o que indica grande risco de aquecimento na abertura do silo afetando a sua estabilidade.

O incremento no nível de lactato nos silos tratados com enzimas amilolíticas, está associado a ação das BAL, que geralmente atuam em uma faixa de pH mais baixa (entre 4,5 e 3,8) do que os demais microrganismos presentes na massa ensilada (WOOLFORD, 1984), utilizando a glicose disponível no meio para formar ácido láctico na proporção 1:2 (KUNG JR et al., 2003) como produto final da sua fermentação (FILYA, 2003). Além disso, o próprio tempo de armazenamento modifica o perfil fermentativo. Arcari et al. (2016), ao avaliar o efeito do tempo de ensilagem do grão de milho moído e reidratado observou que a concentração de ácido láctico com base na MS foi aumentada cerca de 3,45 vezes no período de ensilagem correspondente a 330 dias em relação ao período de 3 dias de ensilagem. Comparativamente, neste trabalho foi possível observar um aumento no teor de lactato em 45 e 59% para  $\alpha$ -AMI e GLU, respectivamente, em relação ao controle.

Os ácidos graxos de cadeia curta, geralmente possuem ação fungistática. Dentre estes ácidos, o acético e propiônico, principalmente o propiônico, por ter ação antifúngica mais potente. *Propionibacterium* é um microrganismo eficiente na utilização do ácido láctico para produção de ácido propiônico e acético, e foi utilizado na inoculação dos tratamentos. Os níveis de ácido acético nos silos tratados com

enzimas foram reduzidos (em 281 e 131% para  $\alpha$ -AMI e GLU, respectivamente) comparados ao controle, o que pode estar relacionado a condição inadequada para o desenvolvimento de bactérias heteroláticas (produtoras de ácido acético além de produzirem o ácido lático) e/ou das enterobactérias e clostrídios, que são os principais competidores das BAL pelos açúcares disponíveis (MUCK, 2010) e dentro do silo são os principais produtores de ácido acético (McDonald, 1991). A inclusão de enzimas também reduziu os níveis de propionato (134% e 85%, para  $\alpha$ -AMI e GLU, respectivamente) em relação ao controle. Mendes, (2013) e Jobim et al.. (1999) registraram a ausência de propionato em silagens de grão úmido de milho, inoculadas com *Propionibacterium*.

Da mesma forma, o butirato teve uma menor concentração nos silos que foram adicionadas as enzimas (315 e 218% para  $\alpha$ -AMI e GLU, respectivamente, em relação ao controle). Um ponto importante é que a via de fermentação butírica leva a uma redução do pH mais demorada, pois o produto desta fermentação é um ácido fraco, e acaba estendendo o processo fermentativo, e segundo Oude Elferink et al. (1999) uma silagem com típica atividade clostridiana é caracterizada por altas concentrações de ácido butírico, o que não seria recomendando pensando na qualidade e biosseguridade do alimento.

Durante a fase de estabilidade do processo fermentativo, ocorre então a diminuição da fermentação de forma que as BAL se tornam os indivíduos dominantes na massa ensilada devido à produção dos ácidos orgânicos, em sua maioria o lático (MACÊDO et al., 2017). Silagens com altas concentrações deste ácido e de açúcares remanescentes são mais afetadas pela deterioração aeróbia (WEINBERG; MUCK, 1996). Os fungos, as leveduras e algumas espécies de bactérias promovem a assimilação aeróbia de lactato da silagem, reduzindo o seu potencial de conservação (PAHLOW et al., 2003), e a presença do acetato, neste aspecto, é positivo pois ele realiza o controle de microrganismos deterioradores após a abertura do silo.

Segundo Mahanna (1994), a concentração de acetato deve ser menor que 0,1%, de propionato entre 0 e 1%, e de butirato menor que 0,1% na MS, para que a silagem de grãos úmidos apresente boa estabilidade após a abertura dos silos. Elevadas concentrações passam a ser um indicativo de que houve alterações indesejáveis no processo de ensilagem (TOMICICH et al., 2003).

#### 4.5. Microbiologia

A contagem de bactérias lácticas foi superior no controle ( $7,06 \text{ UFC log}_{10}^{-1}$ ). As taxas mais elevadas de lactato nos silos tratados (Tabela 7), podem estar relacionadas ao declínio da população de BAL, devido a acidez promovida por esse ácido. Então, ao mesmo tempo que a presença do ácido láctico tem papel fundamental no processo de ensilagem inibindo o crescimento de microrganismos deterioradores, promovendo uma taxa de fermentação mais rápida, menor proteólise, menores teores de ácidos acético e butírico (SILVA et al., 2011) ele também é um aspecto que regula a ação das BAL, quando suas concentrações alteram o pH para valores muito abaixo de 4 (MACÊDO et al., 2017).

A enzima GLU teve bons parâmetros quando observamos a população de fungos, que foram 30% mais baixas ao longo do tempo, seguido de  $\alpha$ -AMI que teve redução em 1% quando comparados ao controle. Este fato relaciona-se com a concentração de ácido acético desses silos, já que este ácido é principal produto do metabolismo das bactérias heteroláticas que utilizam ácido láctico e glicose como substrato para produção de ácido acético e propiônico, os quais são efetivos no controle de fungos, sob baixo pH (SILVA et al., 2011; WOOLFORD, 1976).

A inoculação com bactérias homofermentativas produtoras de ácido láctico pode melhorar a qualidade das silagens promovendo rápida e eficiente produção de ácido láctico e redução do pH (RODRIGUES et al., 2004). No entanto, alta concentração de ácido láctico nem sempre tem efeito positivo sobre a estabilidade aeróbia e a inibição do crescimento de leveduras (WOOLFORD, 1976).

O uso de inoculantes microbianos no alimento têm sido realizado com uma maior frequência no intuito de entender o seu funcionamento. Neste trabalho, apesar de as enzimas utilizadas não terem refletido no aumento da população das BAL elas foram eficientes na manutenção do ambiente dentro do silo para a população de fungos não se sobressaísse as demais. A presença de fungos nos silos altera a concentração de nutrientes das silagens, principalmente em relação à concentração de carboidratos solúveis e vitaminas (SILVA et al., 2011).

#### 4.6. Atividade enzimática

As enzimas necessitam de condições específicas para desenvolverem suas atividades, e as reação enzimática aumentam ou reduzem conforme as características do meio. Geralmente, as amilase mantem mais de 60% de sua atividade catalítica, quando incubadas em valores extremos de pH como 3,0 e 10,5, confirmando a elevada estabilidade estrutural dessas enzimas (GIANNESI et al., 2006). A atuação em uma ampla faixa de pH é uma vantagem para a indústria, uma vez que um menor ajuste do pH seria necessário entre os tratamentos sequenciais de liquefação e sacarificação do amido (MICHELIN et al., 2008).

Para a temperatura, devido a característica termoestável da amilase a hidrólise de alguns amidos (milho, mandioca, amido solúvel e batata) é realizada a temperaturas de 60°C e 70°C (CARVALHO et al., 2008), mas entre 30°C e 50°C, geralmente as amilases conseguem manter a estabilidade. Porém, em temperaturas superiores a 50°C as vezes é observada uma queda acentuada da atividade catalítica (OLIVEIRA et al., 2015). De todo modo a maior atividade enzimática, com conseqüente incremento na quantidade de açúcar redutor mostra que as enzimas exógenas não foram inativadas durante o processo fermentativo no silo.

### 5. CONCLUSÃO

Longos períodos de armazenamento e a adição de amilases influenciaram negativamente as perdas fermentativas, diminuiu o teor de MS, amido, carboidratos não fibrosos e a digestibilidade *in vitro* e aumentou a PB, o EE, e a energia bruta.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho, o ideal seria utilizar os silos em até 89 dias.

### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. P. DE. **Silagem de grão de milho reidratado com soro de leite e água**. 2013. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano, 2013.

AOAC, 2000. Association of official agricultural chemists. **Official Method of Analysis**. (17<sup>th</sup> ed).

ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 60, 2016.

BARON, V. S.; STEVENSON, K. R.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of corn grain ensiled at several levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, n. June, p. 451–461, 1986.

BENTON, J.R., KLOPFENSTEIN, T., ERICKSON, G.E. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Rep.* 31–33, 2005.

CARVALHO, R. V. DE et al. Properties of an amylase from thermophilic bacillus sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 102–107, 2008.

CHAMBERLAIN, D.G. The silage fermentation in relation to the utilization of nutrients in the rumen. **Process Biochemistry**, v.4, n.1, p.60-63, 1987.

CHEN, J.; STOKES, M. R.; WALLACE, C. R. Effects of Enzyme-Inoculant Systems on Preservation and Nutritive Value of Haycrop and Corn Silages. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 2, p. 501–512, 1994.

CHEN, K. H. et al. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grain on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 8, p. 1721–7, 1995.

CORREA, C.E.S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 3008–3012, 2002.

DIORENZO, N. et al. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. *Livestock Science*, v. 137, n. 1–3, p. 178–184, 2011.

DING, M.I., KOIZUMI, H., SUZUKI, Y. Comparison of three chromatographic systems determination of organic acids in wine. **Analytical Sciences**, v. 11, p. 239–243, 1995.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; SPOELSTRA, S. F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculated with. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 4, p. 583–594, 1999.

DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v. 56, n. 4, p. 330–343, 2001.

ERWIN, E.S.; MARCO, G.J.; EMERY, E.M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.44, n.9, p.1768-1771, 1961.

FERRARETTO, L.F.; CRUMP, P.M.; SHAVER, R.D. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 1, p. 533–550, 2013.

FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling,

exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 7318–7327, 2015.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of maize silage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 11, p. 3575–3581, 2003.

FOLDAGER, J. **Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation**. Ph.D. thesis, East Lasing - Michigan State University, 1977.

GIANNESI, G. C. et al. A novel  $\alpha$ -glucosidase from *Chaetomium thermophilum* var. *coprophilum* that converts maltose into trehalose: Purification and partial characterisation of the enzyme. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 8, p. 1729–1735, 2006.

HENDRIX, D. L. Rapid Extraction And Analysis Of Nonstructural Carbohydrates In Plant-Tissues. **Crop Science**, v. 33, p. 1306–1311, 1993.

HILL, J.; LEAVER, J. D. Changes in chemical composition and nutritive value of urea treated whole crop wheat during exposure to air. **Animal Feed Science and Technology**, v. 55, p. 281–301, 2002.

HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465–2474, 2011.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzyme preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 182–193, 2008.

JOBIM, C. C. et al. Desenvolvimento de microrganismos durante a utilização de silagens de grãos úmidos de milho e de espigas de milho sem brácteas. **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 3, p. 671–676, 1999.

JOBIM, C. C. et al. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 101–119, 2007.

JUNGES, D et al. Short communication: influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 9048–9051, 2017.

KLINGERMAN, C. M. et al. An evaluation of exogenous enzymes with amylolytic activity for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 3, p. 1050–1059, 2009.

KULASEK, G. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. **Polskie Archiwum Weterynaryjne**, v.15, n.4, p.801-810, 1972.

KUNG JR, L. et al. Added Ammonia or Microbial Inocula for Fermentation and Nitrogenous Compounds of Alfalfa Ensiled at Various Percents of Dry Matter. **Journal of Dairy Science**, v. 67, n. 2, p. 299–306, 1984.

KUNG JR, L. et al. Effect of Microbial Inoculants on the Nutritive Value of Corn Silage for Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3763–3770, 1993.

KUNG JR, L. **Silage fermentation and additives**. IN: Science and Technology in the Feed Industry. Alltech's Annual Symposium, 17. **Anais...**Minnetonka: Miller Publishing Co, 2001

KUNG JR, L. et al. The effect of treating alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on silage fermentation, aerobic stability, and nutritive value for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 336–343, 2003.

KUNG JR, L. et al. The Effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 on the Fermentation and Aerobic Stability of Ground and Whole High-Moisture Corn. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 5, p. 2309–2314, 2007.

LAWTON, J. W. Zein: A history of processing and use. **Cereal Chemistry**, v. 79, n. 1, p. 1–18, 2002.

LIN, W. L.; FELBERG, R. S.; CLARK, E. DE B. Kinetics of cell growth and heterologous glucoamylase production in recombinant *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 2, p. 273–279, 1993.

LOPES, N. M. **Efeito de enzimas na digestibilidade ruminal e perda de matéria seca da silagem do grão de milho reidratado**. 2016. p. 114. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2016.

MACÊDO, A. J. DA S. et al. Microbiologia de silagens - Revisão de Literatura. **Redvet**, v. 18, n. 9, p. 11, 2017.

MAHANNA, B. Proper management assures high-quality silage, grains. **Feedstuffs**, v. 10, p. 12 - 56, 1994.

McDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON, S.J.E. **The biochemistry of silage**. 2.ed. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.

MENDES, I. A. P. **Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagem de grão de milho moído reidratado substituindo milho seco moído do concentrado**. 2013, 54p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

MICHELIN, M. et al. Purification and biochemical characterization of a thermostable extracellular glucoamylase produced by the thermotolerant fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 1, p. 17–25, 2008.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959.

MORAIS, M. DA G. et al. Inoculação de silagens de grãos úmidos de milho, em diferentes processamentos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 4, p. 969–981, 2012.

MUCK, R. E. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. suppl spe, p. 183–191, 2010.

MUCK, R.E. et al. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. **Journal of Dairy Science**. v. 101, n. 5, p. 3980–4000, 2018.

NOCEK, J. E.; TAMMINGA, S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk yield and composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, p. 3598–3629, 1991.

NOROUZIAN, D.; AKBARZADEH, A.; SHARER, J. M.; MOO-YOURG, M. Fungal glucoamylases. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 80-85, 2006.

NRC. 2001. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7 ed. Washington, D.C.: National Academy Press. 2001. 381p.

OLIVEIRA, A. P. A. DE et al. Bioprospecting of yeasts for amylase production in solid state fermentation and evaluation of the catalytic properties of enzymatic extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 14, p. 1215–1223, 2015.

OLIVEIRA, E. R. et al. Effects of exogenous amylolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and in vivo digestibility of rehydrated corn silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 251, p. 86–95, 2019.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H. et al. **Lactobacillus buchneri can improve the aerobic stability of silage via a novel fermentation pathway, the anaerobic degradation of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol**. International silage conference, 12th. **Anais...**Suécia: SLU Conference Service, 1999.

PAHLOW, G. et al. **Microbiology of Ensiling**. In: DWAYNE R. BUXTON; RICHARD E. MUCK; JOSEPH H. HARRISON. (Ed.). . Silage science and technology. Madison, Wisconsin - USA: American Society of Agronomy, Inc.; Crop Science Society of America, Inc.; Soil Science Society of America, Inc., 2003. p. 31–93.

PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. **Enzyme Technology**. 1<sup>a</sup> ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

PEDROSO, A.F. et al. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. **Scientia Agricola**, v. 62, n. 5, p. 427–432, 2005.

PEREIRA, M. N. et al. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. **Scientia Agricola**, v. 61, n. 4, p. 358–363, 2004.

PIRES, A. V. et al. Substituição de silagem de milho por cana-de-açúcar e caroço de algodão nos parâmetros ruminiais, síntese de proteína microbiana e utilização dos nutrientes em vacas lactantes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, p. 50-58. 2008.

RABELO, C. H. S. et al. Perdas fermentativas e estabilidade aeróbia de silagens de milho inoculadas com bactérias ácido-láticas em diferentes estádios de maturidade. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, n. 3, p. 656–668, 2012.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Efeitos da Adição de Inoculantes Microbianos sobre a

Composição Bromatológica e Perfil Fermentativo da Silagem de Sorgo Produzida em Silos Experimentais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2373–2379, 2002.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Evaluation of microbial inoculation on nutritional and fermentative quality of corn silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 3, p. 538–545, 2004.

RODRIGUES, P. H. M. et al. Effects of microbial inoculants and amino acid production by-product on fermentation and chemical composition of sugarcane silage. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 6, p. 1394–1400, 2012.

SANTOS, M. V. F. et al. Fatores que afetam o valor nutritivo da silagens de forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, p. 25–43, 2010.

SENGER, C. C. D. et al. Composição química e digestibilidade ‘ in vitro ’ de silagens de milho com distintos teores de umidade e níveis de compactação. **Ciência Rural**, v. 35, n. 06, p. 1393–1399, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1997, 295p.

SILVA, T. C. DA et al. Papel da fermentação láctica na produção de silagem. **PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 1, 2011.

SPIER, M. R. **Produção de enzimas amilolíticas fúngicas  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase por fermentação no estado sólido**. 2005. 157p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2005.

THEURER, C. B.; LOZANO, O.; ALIO, A.; DELGADO-ELORDUY, A.; SADIK, M.; HUBER, J. T.; ZINN, R. A. Steam-processed corn and sorghum grain flaked at different densities alter ruminal, small intestinal, and total tract digestibility of starch by steers. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 2824–2831, 1999.

TILLEY, J.M.A.; TERRY, R.A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass Forage Science**, v. 18, p. 104–111, 1963.

TOMICH, T. R. et al. **Características químicas para avaliação do processo fermentativo de silagens: uma proposta para qualificação da fermentação**. Corumbá: Embrapa Pantanal. 2003. 20p. (Embrapa Pantanal. Documento, 57).

TRICARICO, J. M. et al. The effects of an *Aspergillus oryzae* extract containing alpha-amylase activity on ruminal fermentation and milk production in lactating Holstein cows. **Animal Science**, v. 81, n. 03, p. 365–374, 2005.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, n. 1–4, p. 136–150, 2008.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583–97, 1991.

WEINBERG, Z. G. et al. The effect of applying lactic acid bacteria at ensiling on the aerobic stability of silages. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 512–518, 1993.

WEINBERG, Z. G.; MUCK, R. . New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 19, p. 53–68, 1996.

WEINBERG, Z. G. et al. Ensiling fermentation products and aerobic stability of corn and sorghum silages. **Grassland Science**, v. 57, n. 1, p. 46–50, 2011.

WOOLFORD, M. K. A Preliminary Investigation into the Role of Yeasts in the Ensiling Process. p. 29–36, 1976.

WOOLFORD, M. K. 1984. **The Silage Fermentation**. 2nd ed. Marcel. Dekker, New York, NY.

WOOLFORD, M. K. The detrimental effects of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 2, p. 101–116, 1990.

ZANIN, G. M. **Sacarificação de amido em reator de leite fluidizado com enzima amiloglucosidase imobilizada**. 1989. 89p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Engenharia de Alimentos, 1989.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A silagem do grão de milho reidratado é um alimento que tem ganhado cada vez mais espaço nos sistemas de produção de ruminantes, especialmente na bovinocultura leiteira. Aparece como uma ferramenta importante para o driblar as questões relacionadas a vitreosidade dos grãos produzidos no Brasil, e também como uma alternativa as dificuldades de utilização do grão de alta umidade.

Entretanto, é importante ressaltar que é necessário o entendimento das peculiaridades de fermentação que ocorrem nesse alimento, para que ele seja utilizado de forma eficaz, conciliando boas práticas de fabricação e de armazenamento com a conservação do material a ser utilizado.

Por isso, a utilização de aditivos enzimáticos tem sido cada vez mais recorrente no âmbito da conservação de alimento, porém ainda são necessários estudos para o melhor entendimento sobre o funcionamento destes componentes sobre o alimento, e assim melhorar a utilização dos nutrientes e contribuir com o desenvolvimento das cadeias produtivas.

**ANEXOS**Tabela 4. Composição química do milho reidratado e ensilado (g kg<sup>-1</sup> MS).

Item	
Matéria seca (g/kg material natural)	625
Matéria orgânica	983
Proteína bruta	120
Extrato etéreo	50.0
Fibra em detergente neutro	95.0
Amido	688
Fibra em detergente ácido	47.0
Lignina	14.3
Cinzas	17.3
Energia líquida de ganho <sup>1</sup>	2.02

<sup>1</sup>Calculado de acordo com o NRC (2001).

Tabela 5. Perdas fermentativas de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos <sup>1</sup>			EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>				
	CON	$\alpha$ -AMI	GLU		Enzima	Tempo	Interação	C1	C2
				<i>g kg<sup>-1</sup></i>					
Gases (MN)	27,43	38,85	41,58	1,92	0,003	0,001	0,664	0,001	0,522
Gases (MS)	122,27	191,68	206,57	5,38	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,678
Eflu. <sup>4</sup> (MN)	2,22	2,75	2,78	0,57	<,0001	<,0001	0,030	<,0001	0,678
Eflu. <sup>4</sup> (MS)	19,8	22,82	23,32	0,47	0,001	<,0001	0,050	<,0001	0,593
Total (MS)	142,07	215,00	229,34	5,41	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,069
Rec. <sup>5</sup> (MS)	850,23	770,66	785,00	5,41	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,069

<sup>1</sup>CONT (Controle),  $\alpha$ -AMI (amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 400 U mL<sup>-1</sup>); GLU (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>).

<sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup>Contrastes ortogonais C1 (CON vs  $\alpha$ -AMI + GLU); C2( $\alpha$ -AMI vs GLU).<sup>4</sup>Efluente. <sup>5</sup>Recuperação.

Tabela 6. Valor nutricional de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos <sup>1</sup>			EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>				
	CON	$\alpha$ -AMI	GLU		Enzima	Tempo	Interação	C1	C2
	<i>g kg<sup>-1</sup> MS</i>								
MS	585,35	550,28	541,89	3,09	<,0001	<,0001	<,0001	0,001	<,0001
MO	984,12	984,93	985,29	0,50	0,326	<,0001	<,0001	0,152	0,659
PB	75,77	83,63	85,28	1,11	<,0001	<,0001	0,003	<,0001	0,431
EE	14,77	20,01	19,87	0,70	<,0001	0,002	<,0001	<,0001	0,918
Amido	626,04	550,36	525,44	6,89	<,0001	<,0001	0,006	<,0001	0,028
CNF	774,78	764,84	759,59	3,11	0,021	<,0001	0,338	0,009	0,333
FDN	119,46	116,45	120,54	2,57	0,655	<,0001	0,304	0,809	0,377
FDA	84,96	81,95	86,04	2,57	0,655	<,0001	0,304	0,8094	0,377
Lignina	18,53	22,66	24,82	0,64	<,0001	0,393	0,041	<,0001	0,127
Cinzas	15,88	15,06	14,71	0,50	0,326	<,0001	<,0001	0,152	0,659
NDT <sup>4</sup>	876,07	881,71	868,66	9,33	0,477	<,0001	0,320	0,923	0,226
DivMS	934,43	921,34	914,66	5,28	0,118	<,0001	0,008	0,050	0,490
	<i>Mcal.kg<sup>-1</sup> MS</i>								
EB	4,12	4,20	4,17	0,03	0,015	<,0001	0,796	0,007	0,261
ED <sup>5</sup>	3,85	3,87	3,88	0,04	0,477	<,0001	0,320	0,923	0,226
EM <sup>6</sup>	3,44	3,47	3,41	0,04	0,466	<,0001	0,314	0,909	0,219
EL <sub>L</sub> <sup>7</sup>	2,02	2,04	2,00	0,02	0,488	<,0001	0,311	0,946	0,232

<sup>1</sup>CONT (Controle),  $\alpha$ -AMI (amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 400 U mL<sup>-1</sup>); GLU (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>).  
<sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup>Contrastes ortogonais C1 (CON vs  $\alpha$ -AMI + GLU); C2( $\alpha$ -AMI vs GLU). <sup>4</sup>Nutrientes digestíveis totais. <sup>5</sup>Energia digestível. <sup>6</sup>Energia metabolizável. <sup>7</sup>Energia

Tabela 7. Perfil microbiano e fermentativo de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos <sup>1</sup>			EPM <sup>2</sup>	Valor de P <sup>3</sup>				
	CON	$\alpha$ -AMI	GLU		Enzima	Tempo	Interação	C1	C2
Contagem microbiana ( $\log_{10}$ )									
BAL <sup>4</sup>	7,06	5,20	4,63	0,12	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Aeróbias	7,35	5,21	5,70	0,11	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Anaeróbias	7,43	5,65	5,13	0,13	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Fungos (totais)	6,60	6,53	5,08	0,12	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
Perfil fermentativo									
pH	4,06	3,54	3,52	0,04	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,381
N-NH <sub>3</sub> (mg dL <sup>-1</sup> )	11,34	8,21	8,04	0,63	0,046	0,438	0,128	0,013	0,910
<i>mmol</i>									
Etanol ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	5,49	23,07	23,44	1,23	<,0001	0,007	0,005	<,0001	0,859
Lactato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	4,37	6,35	6,94	0,28	<,0001	<,0001	0,006	<,0001	0,205
Acetato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	31,69	8,31	13,74	1,69	<,0001	<,0001	0,008	<,0001	0,070
Propionato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	0,96	0,41	0,52	0,05	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,098
Butirato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	1,91	0,46	0,60	0,14	<,0001	0,008	0,005	<,0001	0,582
Isobutirato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	0,26	0,30	0,28	0,007	0,007	<,0001	<,0001	0,001	0,029
Valerato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	0,54	0,54	0,54	0,01	0,971	<,0001	0,003	0,930	0,823
Isovalerato ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	0,56	0,58	0,57	0,01	0,532	<,0001	<,0001	0,335	0,565
AGCR <sup>4</sup> ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	1,40	1,43	1,38	0,03	0,739	<,0001	<,0001	0,851	0,452
Totais ( $g\ kg^{-1}\ MS$ )	35,96	10,60	16,24	1,81	<,0001	<,0001	0,002	<,0001	0,067

<sup>1</sup>CONT (Controle),  $\alpha$ -AMI (amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 400 U mL<sup>-1</sup>); GLU (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U mL<sup>-1</sup>).

<sup>2</sup>EPM (erro padrão da média). <sup>3</sup>Contrastes ortogonais C1 (CON vs  $\alpha$ -AMI + GLU); C2( $\alpha$ -AMI vs GLU). <sup>4</sup>AGCR (Totais de ácidos graxos de cadeia ramificada).

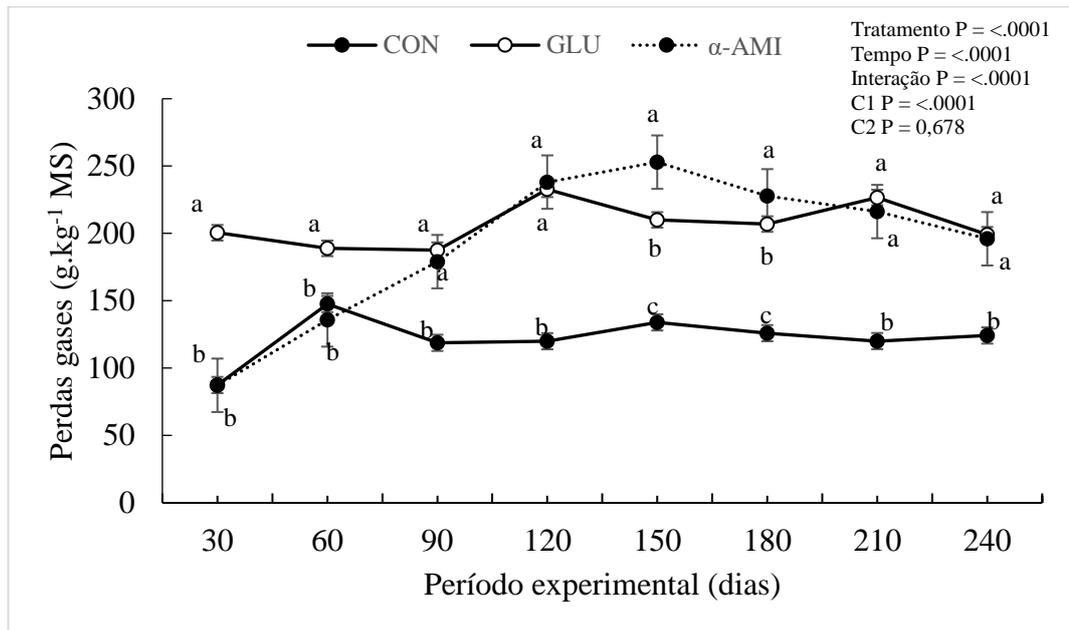


Figura 2. Perda de gases (g kg<sup>-1</sup>MS) em função dos tratamentos ao longo do período experimental.

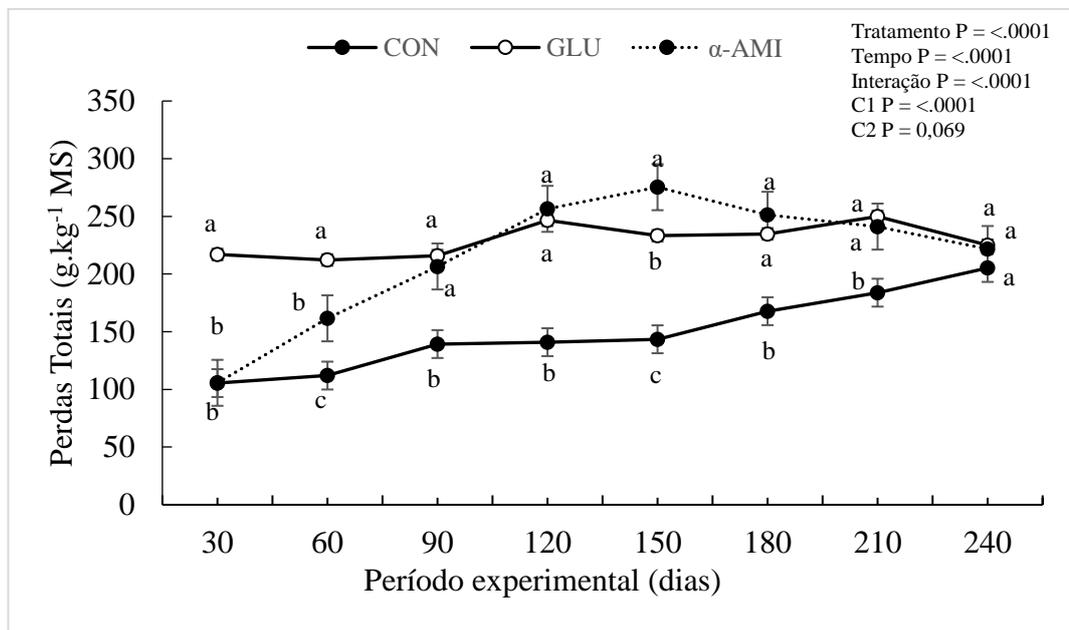


Figura 3. Perdas totais (g kg<sup>-1</sup>MS) em função dos tratamentos ao longo do período experimental.

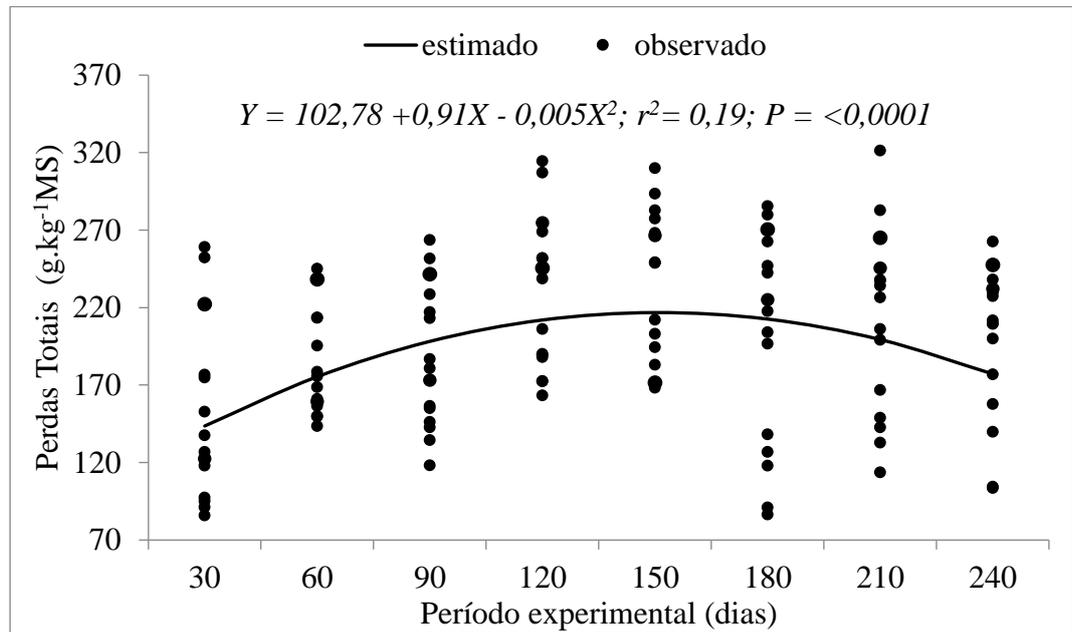


Figura 4. Regressão polinomial simples das perdas totais (g kg<sup>-1</sup>MS) em relação ao tempo de armazenamento da silagem de grão de milho reidratado.

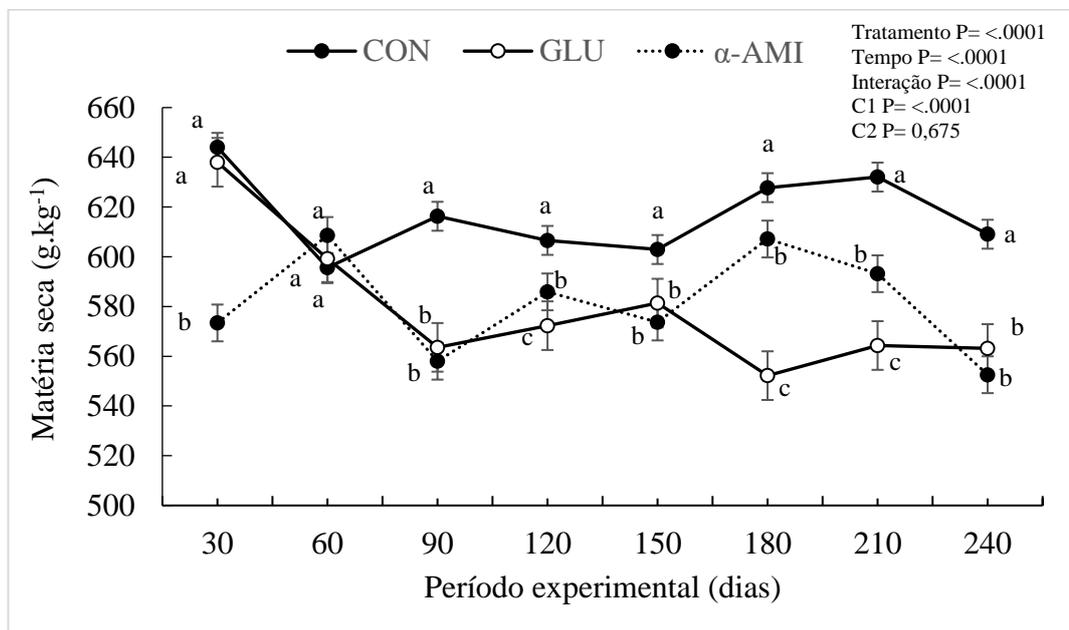


Figura 5. Teor de MS (g kg<sup>-1</sup>) no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais.

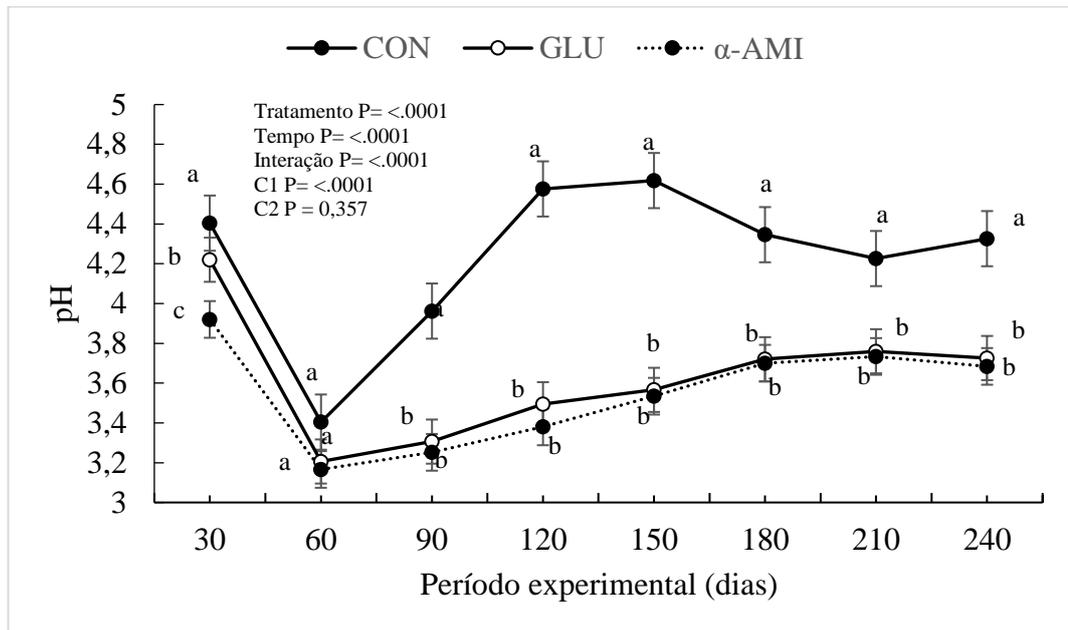


Figura 6. Concentração de pH no período de exposição ao oxigênio em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais.

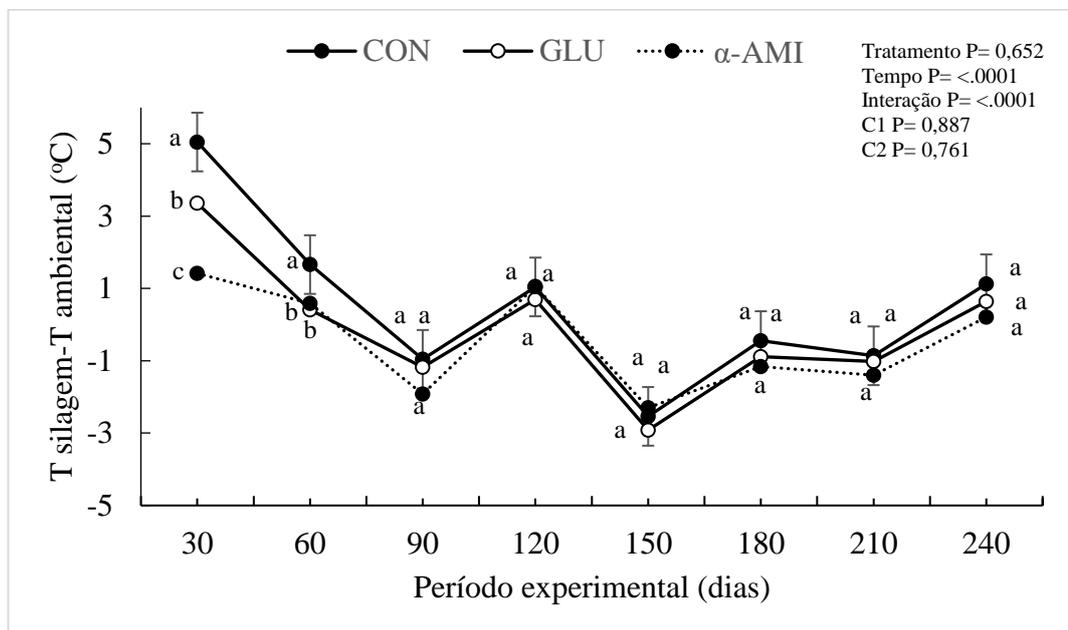


Figura 7. Variação da diferença de temperatura (°C) da silagem e do ambiente, no período de exposição ao oxigênio, em relação aos tempos de armazenamento de acordo com os tratamentos experimentais.

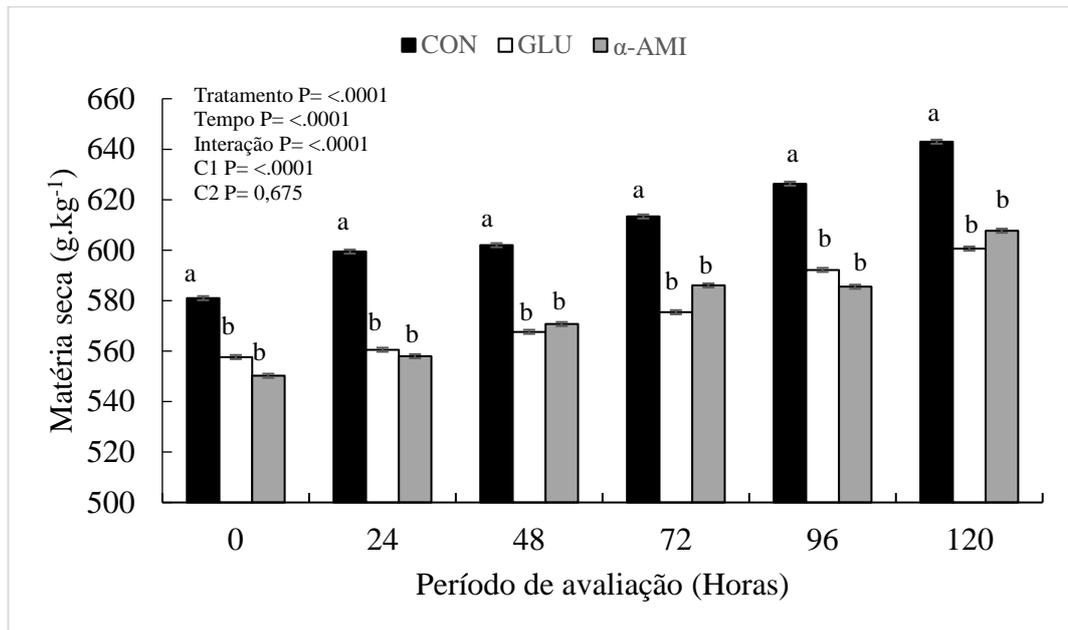


Figura 8. Teor de MS (g kg<sup>-1</sup>) no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais.

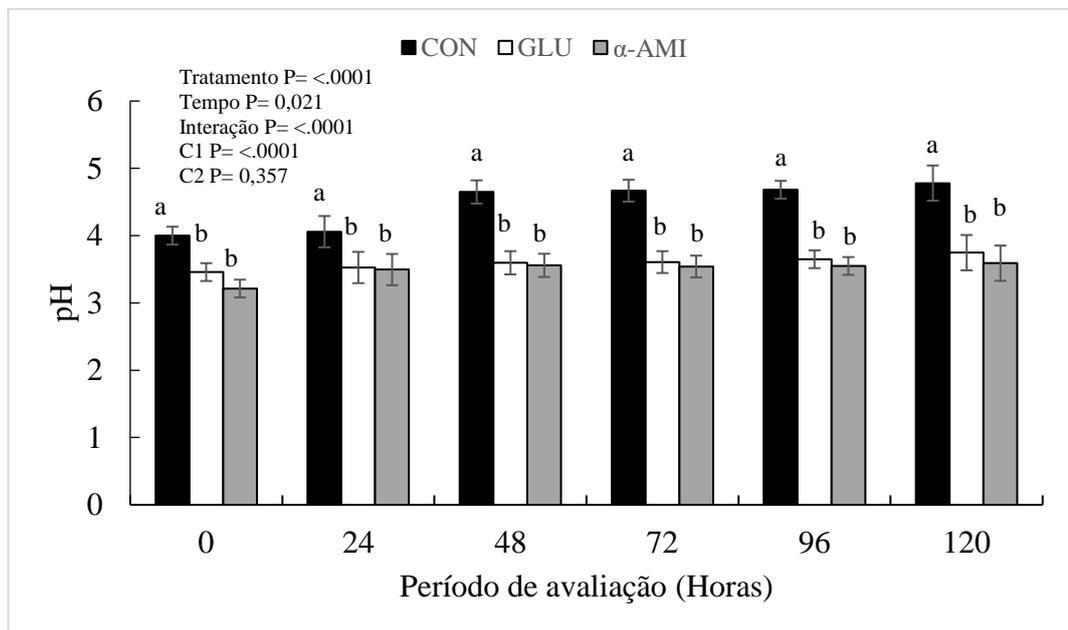


Figura 9. Concentração de pH no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais

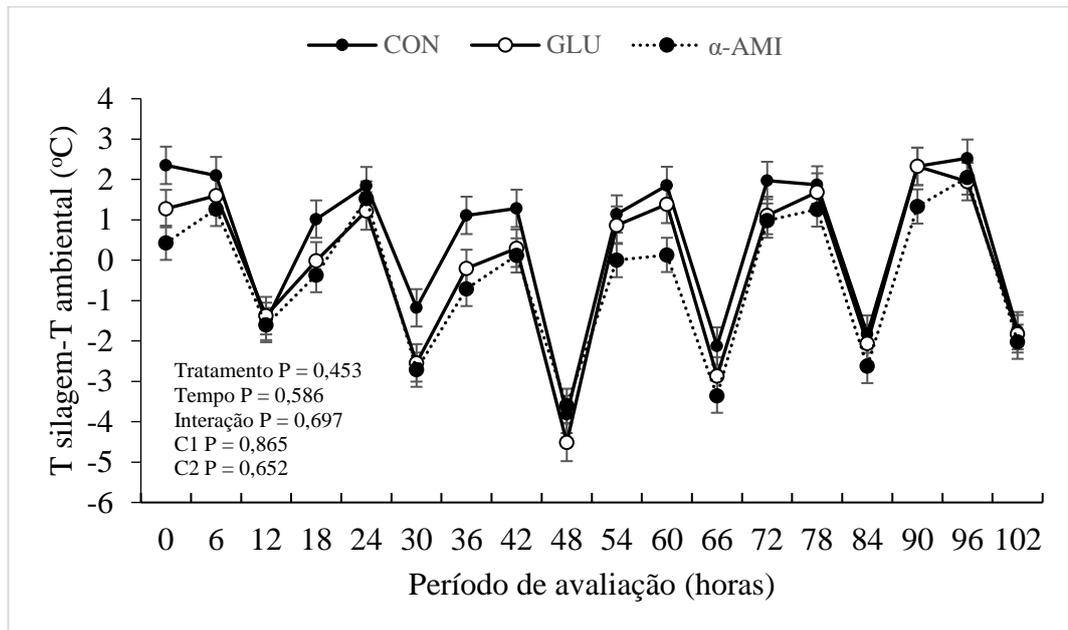


Figura 10. Variação da temperatura (°C) no período de exposição ao oxigênio de acordo com os tratamentos experimentais.

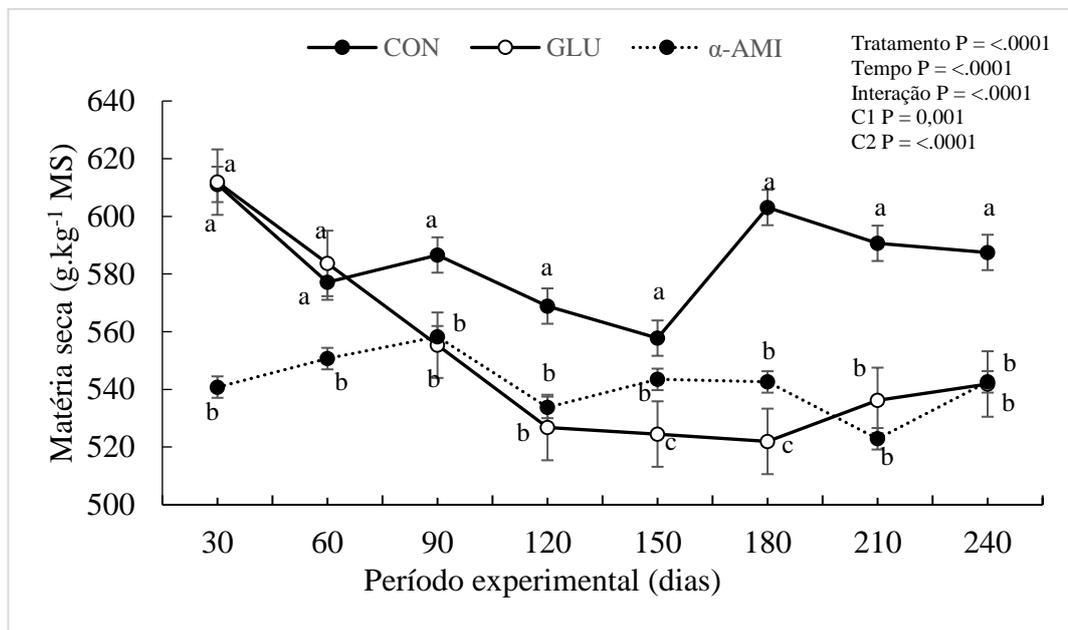


Figura 11. Teor de MS (g kg<sup>-1</sup> MS) ao longo do período experimental.

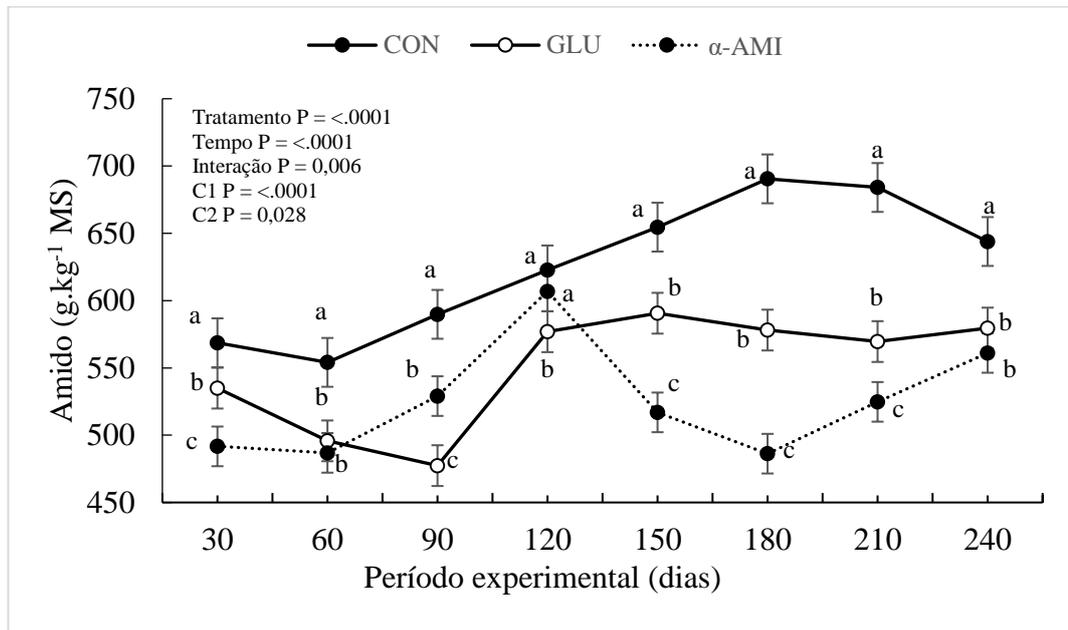


Figura 12. Teor de amido ( $\text{g kg}^{-1}$  MS) ao longo do período experimental.

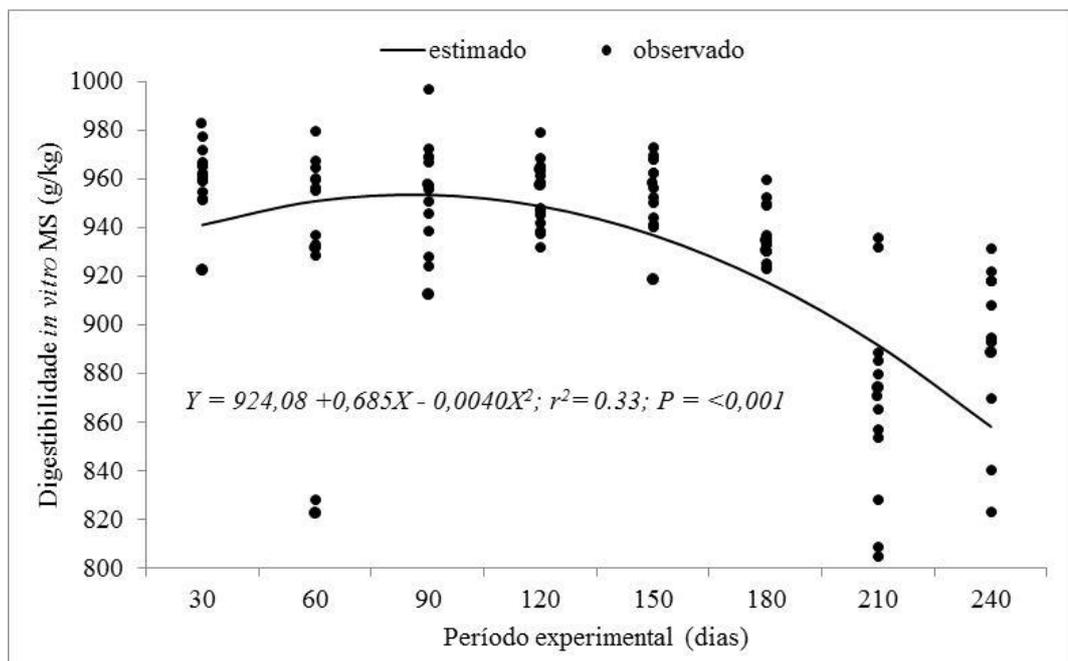


Figura 13. Regressão polinomial simples da DIVMS ( $\text{g kg}^{-1}$ ) em relação ao tempo de armazenamento da silagem de grão de milho reidratado

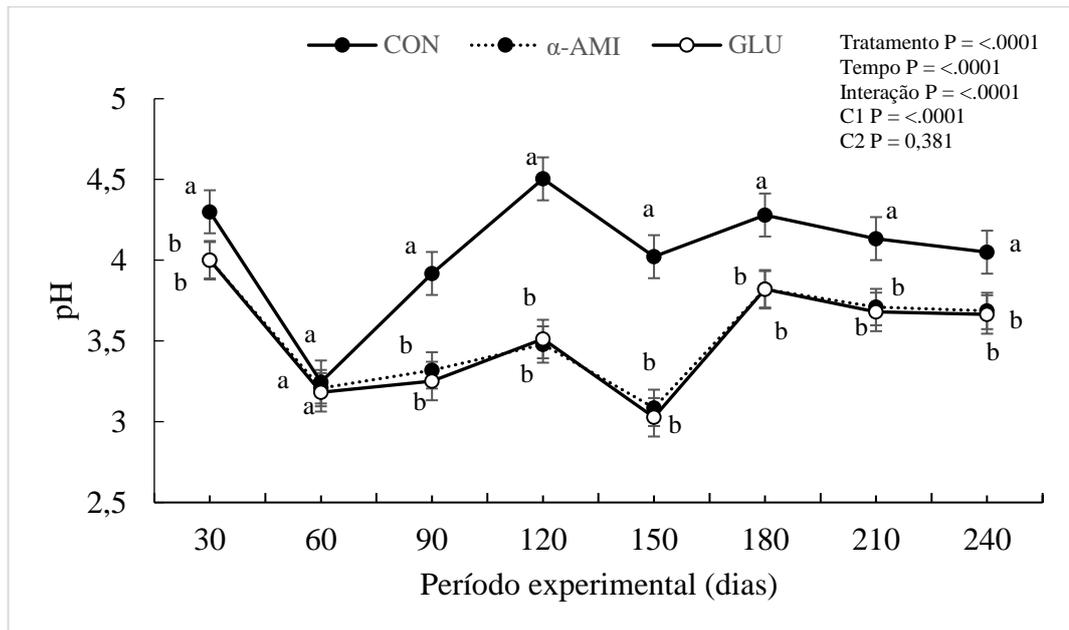


Figura 14. Concentração de pH nos tratamentos ao longo do período experimental.

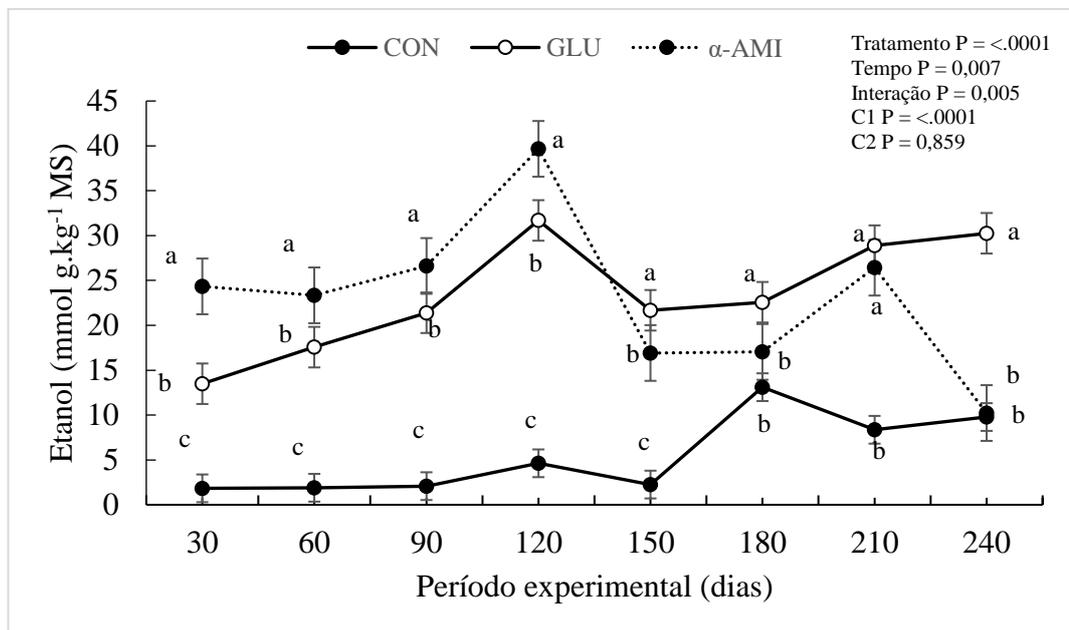


Figura 15. Níveis de etanol (mmol g kg<sup>-1</sup> MS) ao longo do período experimental.

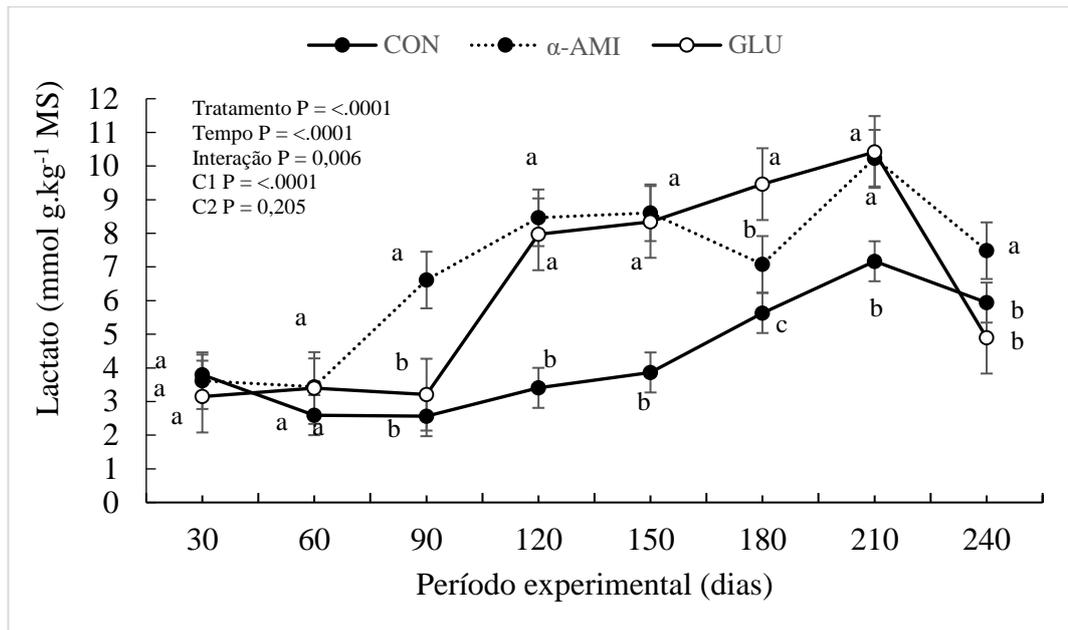


Figura 16. Níveis de lactato (mmol g kg<sup>-1</sup> MS) ao longo do período experimental.

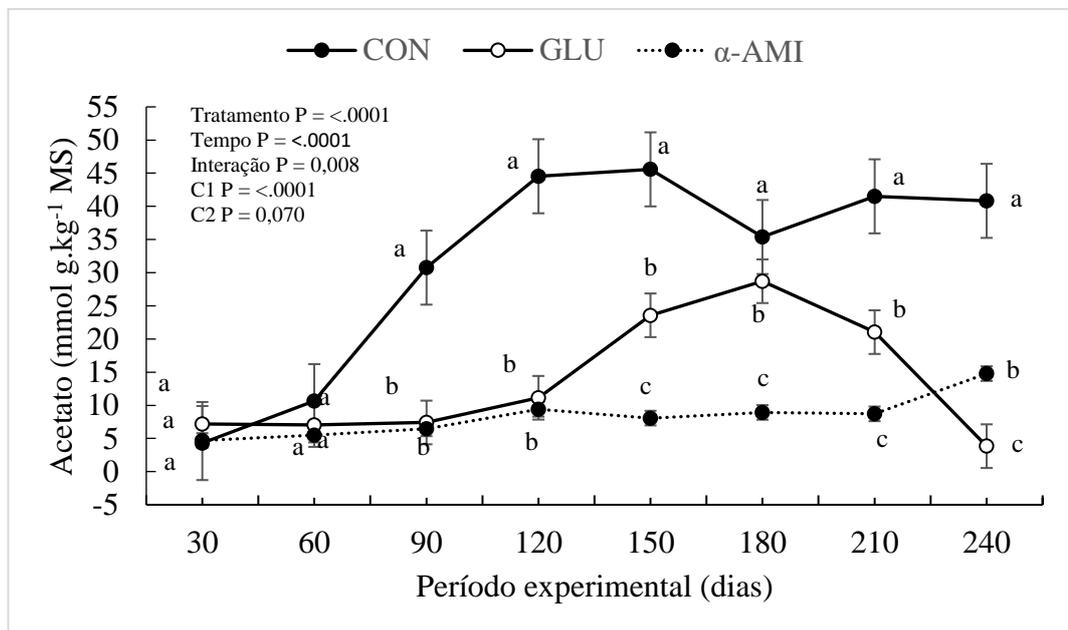


Figura 17. Níveis de acetato (mmol g kg<sup>-1</sup> MS) ao longo do período experimental.

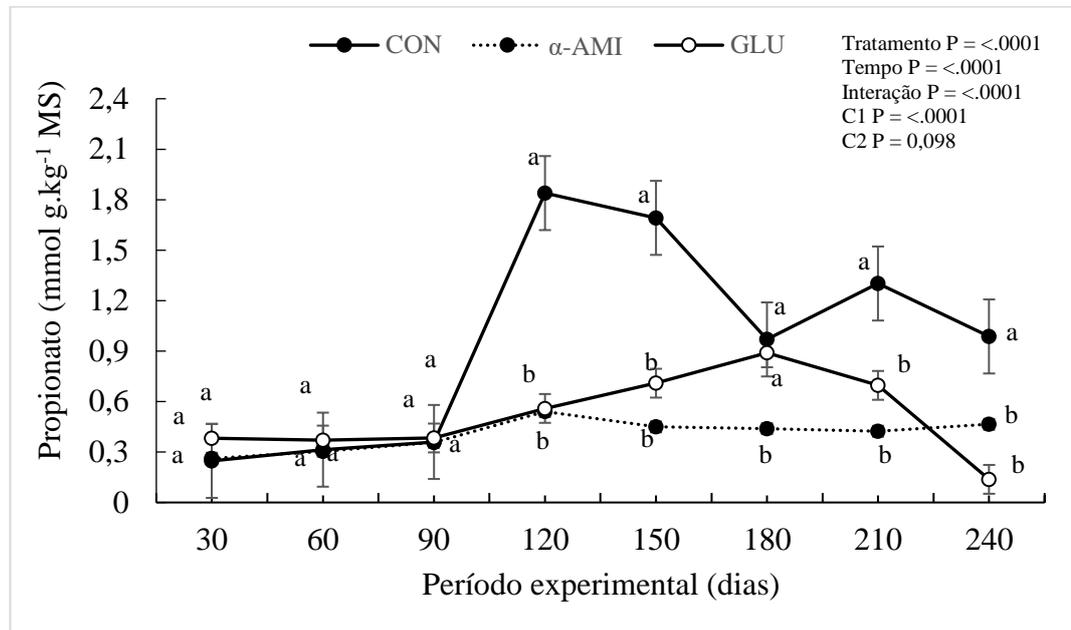


Figura 18. Níveis de propionato (mmol g kg<sup>-1</sup> MS) ao longo do período experimental.

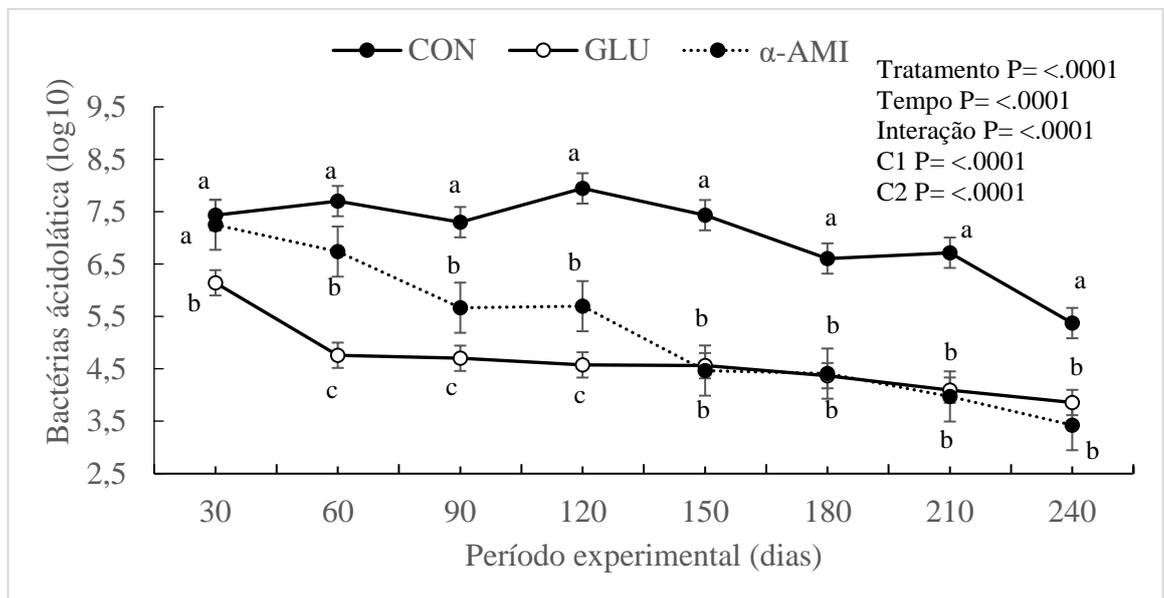


Figura 19. População de BAL (log<sub>10</sub>) ao longo do período experimental.

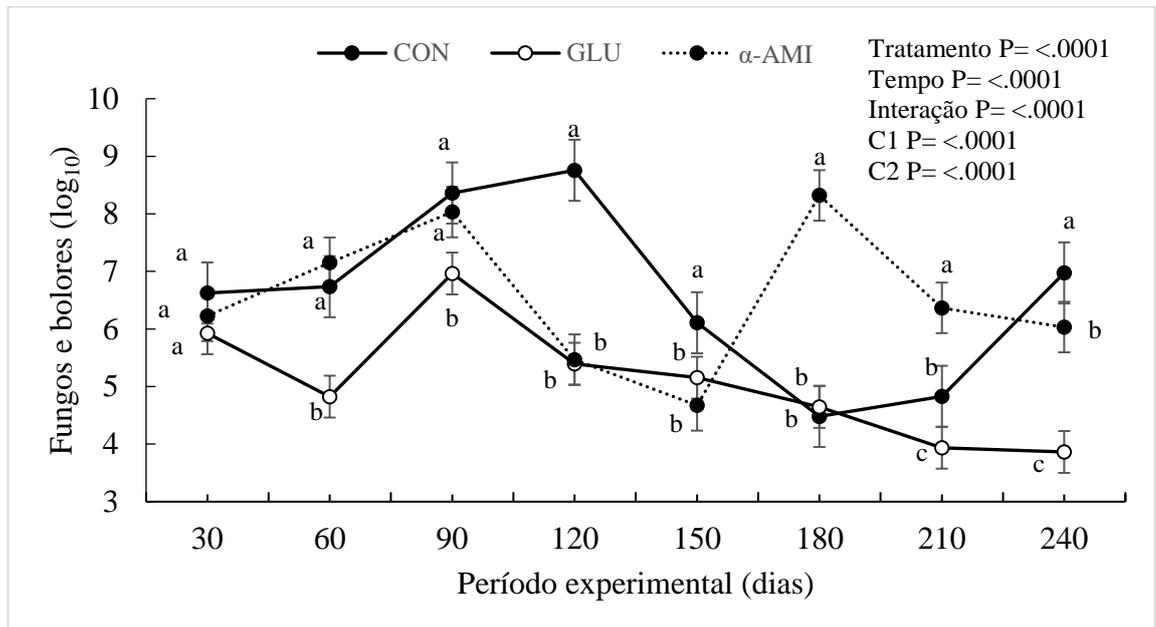


Figura 20. População de fungos ( $\log_{10}$ ) ao longo do período experimental.

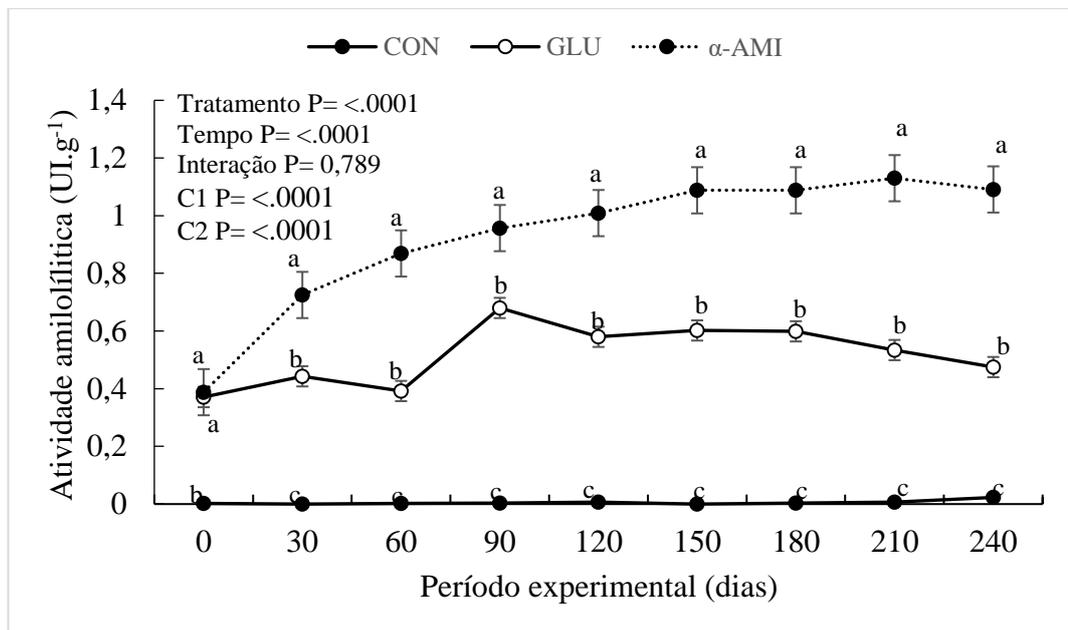


Figura 21. Atividade amilolítica ( $\text{UI g}^{-1}$ ) ao longo do período experimental.

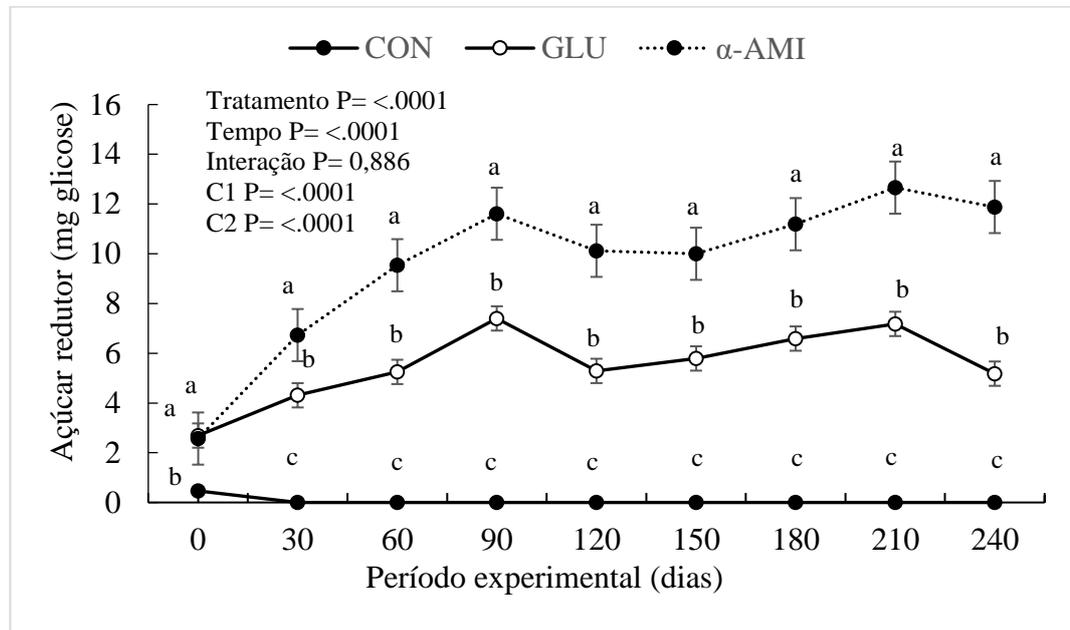


Figura 22. Teores de açúcar redutor (mg glicose) ao longo do período experimental.