

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

SUELLEN DE SOUZA VALENSUELA

**TEMPO DE ARMAZENAMENTO E AÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS EM
SILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO REIDRATADO: ATIVIDADE
ENZIMÁTICA, POPULAÇÃO MICROBIANA E ESTABILIDADE AERÓBIA.**

Trabalho de Conclusão de Curso

Dourados/MS- Brasil

2017

SUELLEN DE SOUZA VALENSUELA

TEMPO DE ARMAZENAMENTO E AÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS EM
SILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO: REIDRATADO: ATIVIDADE ENZIMÁTICA,
POPULAÇÃO MICROBIANA E ESTABILIDADE AERÓBIA.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a
Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
para a obtenção do título de Bacharel em
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra

Dourados/MS- Brasil

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

V153t Valensuela, Suellen De Souza

Tempo de armazenamento e ação de enzimas amilolíticas em silagem de grão úmido de milho reidratado: atividade enzimática, população microbiana e estabilidade aeróbia. / Suellen De Souza Valensuela -- Dourados: UFGD, 2017. 41f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Jefferson Rodrigues Gandra

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. glucoamilase. 2. α -amilase. 3. Zea mays L. 4. perfil fermentativo. 5. estabilidade aeróbia. I. 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.

SUELLEN DE SOUZA VALENSUELA

TEMPO DE ARMAZENAMENTO E AÇÃO DE ENZIMAS AMIOLÍTICAS EM
SILAGEM DE GRÃO ÚMIDO DE MILHO: REIDRATADO: ATIVIDADE ENZIMÁTICA,
POPULAÇÃO MICROBIANA E ESTABILIDADE AERÓBIA.

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia pela Universidade Federal da Grande Dourados, com a comissão formada por:

Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Mábio Silvan José da Silva
Universidade Federal da Grande Dourados

MSc. Jamilye Débora Batista de Oliveira
Universidade Federal da Grande Dourados

25 de Agosto de 2017
Dourados/MS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir que eu aqui chegasse, guiando meus passos na direção certa ao longo da minha vida, e não somente nestes anos como acadêmica do curso de Biotecnologia, mas em todos os momentos, pois ele é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A minha mãe e amiga Lucineia, heroína que me apoiou e incentivou em horas difíceis, de desânimo e cansaço. A minha avó Edith, sempre torcendo pelas minhas vitórias e se orgulhando de cada nova conquista em minha vida. Tenho imenso orgulho e admiração, meu porto seguro. Amo vocês!

Ao meu irmão Leandro, pela parceria e pela torcida constante. Obrigado amo você!

Ao meu noivo Jonatan, que esteve ao meu lado desde o início. Obrigado pela paciência e carinho a cada nova temporada de fim de semestre, pelo incentivo e dedicação, pelo consolo em situações difíceis, por não permitir que eu pensasse em desistir e pela parceria de sempre. Amo você!

Ao meu orientador Prof^o. Dr^o. Jefferson Rodrigues Gandra, muito obrigado pela oportunidade de trabalhar ao seu lado, pelos conhecimentos a mim concedidos, pela orientação, paciência e, dedicação.

Aos professores Dr^a Kelly Mari Pires de Oliveira e Dr^o Rodrigo Simões Ribeiro Leite, muito obrigado por transferirem a mim conhecimentos de suas respectivas áreas de atuação, e por abrirem as portas de seus laboratórios, permitindo a realização de meus experimentos.

As técnicas e mestrandas dos laboratórios de Enzimologia e Microbiologia Aplicada, pelo carinho, amizade e por estarem sempre prontas a ajudar. Obrigado pelos ensinamentos e ajuda na realização das análises.

As minhas amigas e parceiras de laboratório Dalila, Karina e Daiane, obrigada por cada momento que vivemos juntas, sem vocês esse experimento não teria acontecido. Obrigado pela amizade, carinho e dedicação, vocês foram e sempre serão exemplo de dedicação e companheirismo em minha vida. Amo vocês!

Aos meus amigos de graduação Jhon, Ana Claudia, Kamila, Bianca, Gabbi (Caroline), Carol, Matheus, Lucas, Andreza, Maysa, Romário e em especial a Bruna, que estiveram presente em diversos momentos desta caminhada, que apesar das diferenças me ensinaram a amar cada um de vocês. Obrigado pelo companheirismo, risadas, lágrimas e aprendizado que compartilhamos. Obrigada a cada um de vocês, que de maneiras diferentes, contribuíram para minha formação, e em contribuição a tudo isso, espero ter também contribuído a cada um de vocês. Serão sempre a minha V Turma de Biotecnologia.

Aos funcionários e professores da Universidade Federal da Grande Dourados, em especial aos professores do curso de Biotecnologia, por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de formação

profissional, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“A menos que modifiquemos à nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”

Albert Einstein

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de enzimas amilolíticas em associação com inoculante bacteriano sobre a microbiota e estabilidade aeróbia de silagens de grãos úmidos de milho. Aplicaram-se os seguintes tratamentos a silagens de grãos úmidos de milho: 1) Controle (CON) sem enzimas amilolíticas; 2) Glucoamilase (GLU), com 300 mL/t de matéria fresca 35,563 UI/ml (Kerazyme 4560, Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, RS); 3) Alfa-amilase (α -AMI), com 300 mL/t de matéria fresca 49,473 UI/mL (Kerazyme 4577, Kera Nutrição Animal). Todos os tratamentos também foram inoculados com KeraSIL grão úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado. Após 35 dias os silos foram abertos, coletaram-se amostras de 200 g das silagens, as quais foram utilizadas para identificação e quantificação da microbiota presente (bactérias lácticas, anaeróbia, aeróbia, fungos filamentosos e leveduras) e determinação da estabilidade aeróbia em diferentes tempos. O tratamento α -AMI apresentou maior contagem de bactérias ácido lácticas (BAL), assim como de anaeróbia e aeróbias, quando comparada com GLU e CON. O tratamento GLU não apresentou diferença na contagem de bactérias anaeróbias em relação a CON. GLU e α -AMI apresentaram baixas contagem de fungos filamentosos e leveduras não diferindo entre si, enquanto CON apresentou alta contagem. O tratamento α -AMI não se diferiu de CON na contagem de fungos filamentosos e leveduras em todos os tempos testados para estabilidade aeróbia. Enquanto GLU até 72 horas após a abertura dos silos, permaneceu com baixa contagem de fungos, em relação a α -AMI e CON. Após 96 horas os tratamentos não diferiram entre si para quantidade de fungos. A adição de α -AMI na silagem de grão úmido, melhorou o perfil microbiológico. A adição de GLU aumentou a estabilidade aeróbia em até 72 horas após aberturas dos silos.

Palavras-chaves: Glucoamilase, α -amilase, *Zea mays* L, fermentativo, estabilidade aeróbia.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the influence of amylolytic enzymes in association with bacterial inoculant on the microbiota and aerobic stability of damp grain corn silage. The following treatments have been applied the damp grain corn silage: 1) Control (CON) without amylolytic enzymes; 2) Glucoamylase (GLU), with 300 mL/ton fresh matter 35.563 IU/ml (Kerazyme 4560, Kera Animal Nutrition, Bento Gonçalves, RS); 3) Alpha-amylase (α -AMI), with 300 mL/ton fresh matter 49.473 IU/mL (Kerazyme 4577, Kera Animal Nutrition). All treatments were also inoculated with KeraSIL damp grain® (Kera Animal Nutrition, Bento Gonçalves, Brazil) constituted of *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) and *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} cfu/g), added in a proportion of 4 g/ton of ground corn hydrated. After 35 days the silos were opened, collected samples of 200 g of silage, which were used for identification and quantification of the present microbiota (lactic, anaerobic, aerobic, filamentous fungi and yeasts) and determination of the aerobic stability in different times. The α -AMI treatment showed the highest count of lactic acid bacteria (LAB), as anaerobic and aerobic, then compared with GLU and CON. Treatment the GLU did not show difference in the count of anaerobic bacteria in relation to CON. GLU and α -AMI showed low count of filamentous fungi and yeasts did not differ amongst them, while CON presented high count. The α -AMI treatment did not differ from CON in the count of filamentous fungi and yeasts at all times tested for aerobic stability. While GLU until 72 hours after the opening of the silos remained with low fungal counts in relation to α -AMI and CON. After 96 hours the treatments did not differ among themselves for quantity of fungi. Adding α -AMI in damp grain silage improved microbiological profile. The addition of GLU increased aerobic stability until 72 hours after opening times the silos.

Keywords: Glucoamylase, alpha-amylase, *Zea mays* L, fermentation profile, aerobic stability.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1: Caracterização da atividade enzimática das enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI durante a ensilagem de grão úmido de milho.

Ilustração 2: Caracterização da quantidade de açúcar redutor total, proveniente da hidrólise do amido realizada pelas enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI durante a ensilagem de grão úmido de milho.

Ilustração 3: Influência da inoculação das enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI na microbiologia da silagem de grão úmido de milho na abertura dos silos.

Ilustração 4: Influência da inoculação das enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI na estabilidade aeróbia da silagem de grão úmido de milho após a abertura dos silos.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BAL - Bactérias ácido-láticas;

BAP – Bactérias ácido propiônico;

CHO's - carboidratos solúveis.

CON – Controle;

CO₂ - Dióxido de carbono;

FCA - Faculdade de Ciências Agrárias;

FCBA - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais;

MS - Matéria seca;

UFC - Unidade Formadora de Colônias;

UFGD - Universidade Federal da Grande Dourados;

α – Alfa;

β – Beta.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Ensilagem de grão úmido de milho	15
3.2. Perfil microbiológico da silagem.....	16
3.2.1 Bactérias Ácido Láticas	17
3.2.2. <i>Bacillus</i>	17
3.2.3. Fungos filamentosos e leveduras	18
3.2.4. <i>Clostridium</i>	19
3.3. Inoculantes bacterianos	20
3.4. Uso de aditivos enzimáticos	21
3.4.1 Enzimas amilolíticas	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Preparo da silagem	24
4.2. Análise enzimática.....	25
4.3. Análise microbiológica.....	26
4.4. Análise estatística	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

Devido a evolução da pecuária brasileira, tem se adotado sistemas mais eficientes na conservação dos alimentos destinados aos animais, aos quais necessitam de alimentação balanceada e com alto valor nutritivo. Nesse sentido a produção de silagem, requer uma espécie de forragem que tenha alta produção, e que seja um alimento de elevada qualidade para os animais.

Segundo McDonald, Henderson e Heron (1991) o milho (*Zea mays* L.) é considerado uma espécie ideal para ensilagem, por apresentar quantidade relativamente alta de matéria seca (MS), baixa capacidade tampão e níveis adequados de carboidratos solúveis (CHO's) para fermentação. Apesar das maiores perdas nutricionais ocorra durante a fermentação, parte dos nutrientes podem perdidos durante a exposição ao ar, devido à instabilidade aeróbia dessa silagem, dada pela alta oxidação de substratos, e ação de microrganismos oportunistas (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005).

Nesse sentido, a utilização de aditivos específicos para silagens são aplicados, como forma de reduzir perdas durante a fermentação e elevar a qualidade da silagem. Esses inoculantes são constituídos de bactérias ácido lácticas (BAL) que com rapidez e eficiência, proporcionam a diminuição do pH da massa de forragem, reduzindo a ação de microrganismos degradadores como fungos filamentosos e leveduras.

A introdução de aditivos enzimáticos, tem se mostrado uma ação promissora, no aumento da digestibilidade, palatabilidade e estabilidade aeróbia, melhorando assim o desempenho e rentabilidade das silagens. Normalmente são classificados com base nos compostos ao qual atuam na degradação, como as celulases, xilanases, ligninases e amilases, que atuam respectivamente sobre celulose, xilana, lignina e amido (CAMPESTRINI et al., 2005; McALLISTER et al., 2001).

O amido é o carboidrato encontrado em maior quantidade em grãos de milho, e representa um dos maiores componentes presentes nas dietas de bovinos de alta produtividade. A utilização de aditivos enzimáticos, adicionados na dieta desses animais pode permitir melhora na produtividade, por proporcionar uma maior disponibilidade de amido em forma livre, que é assim mais facilmente consumível pelos animais.

A necessidade de aumentar a produção de alimentos de origem animal, determinou uma melhora na alimentação dos ruminantes, exigindo que esses animais tenham acesso a uma dieta balanceada, rica em nutrientes, livre de contaminantes, e que seja de fácil introdução na rotina do campo.

A ensilagem de grãos de milho, é uma técnica importante no aumento do valor nutritivo do milho. A utilização de inoculantes bacterianos e aditivos enzimáticos, se apresenta como uma forma de manipulação benéfica, com o intuito de fornecer melhorias nutricionais, vinculada a melhora da microbiota da silagem e também atuando na extensão do tempo de armazenamento desse alimento, reduzindo as perdas nutricionais.

2. OJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a ação de enzimas amilolíticas sobre a microbiologia e estabilidade aeróbia da silagem de grãos úmidos de milho reidratado

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a eficiência da enzima comercial Glucoamilase em associação com inoculante contendo *L. plantarum* e *P. Propionibacterium*, sobre as características de microbiota, como proliferação de bactérias lácticas, anaeróbias, aeróbias e fungos sobre características de manutenção da estabilidade aeróbia na silagem de grãos úmidos de milho reidratado, em diferentes tempos de análise;

Avaliar a eficiência da enzima comercial α -Amilase em associação com inoculante contendo *L. plantarum* e *P. Propionibacterium*, sobre as características de microbiota, como proliferação de bactérias lácticas, anaeróbias, aeróbias e fungos sobre características de manutenção da estabilidade aeróbia na silagem de grãos úmidos de milho reidratado, em diferentes tempos de análise.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ensilagem de grãos úmidos de milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma monocotiledônea originária da América, uma das culturas mais antigas e mais produzidas no mundo (CANÇADO, 2004). Em função de seu alto potencial produtivo, valor nutritivo e composição química, grande parte da sua produção se destina para a formulação de ração de aves, suínos e bovinos que compõem setores de grande importância econômica e social mundialmente (ANDRADE, 2013; MOMBACH, 2014).

No Brasil a base da dieta de ruminantes é composta por forragens, o milho por ser rico em amido, apresenta-se como uma opção de alimento importante durante o período de estiagem (ANDRADE, 2013; CORREA et al., 2002; LUCCI et al., 2008). Dentro da classificação botânica planta pertence à ordem *Poales*, família *Poaceae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays* Linnaeus.

Tradicionalmente o milho (planta inteira) é o material mais utilizado para ensilagem, devido sua composição bromatológica que preenche requisitos básicos para uma silagem de boa qualidade, como teor de matéria seca (MS) entre 30% a 35%, e no mínimo 3% de carboidratos solúveis na matéria original, baixo poder tampão e por possibilitar uma boa fermentação microbiana (NUSSIO et al., 2001).

O amido presente em grãos de milho, é composto basicamente por dois tipos de moléculas: amilose, polímero linear de moléculas de D-glicose, unidas por ligações α -1,4, e amilopectina, polímero com ramificações, formado por uma cadeia principal linear de glicose (α -1,4) com ramificações α -1,6 (BITENCOUORT, 2012; FRENCH, 1973).

As proporções dessas moléculas nos grãos variam, mas pode chegar a 27% e 72% respectivamente, o que lhe confere um elevado valor energético, pois o amido apresenta-se na forma mais facilmente digerível. Possui ainda lipídios como ácidos graxos, além de uma elevada aceitabilidade, elevado teor de fósforo, riqueza em caroteno e baixo nível de cálcio (ANDRADE 2013; BUTOLO, 2002).

Uma estratégia eficiente de processamento e conservação de grãos de milho, a fim de minimizar perdas nutricionais, é a ensilagem de grãos com alta umidade (MORAIS, 2016). O processo consiste na colheita do material, moagem, reidratação e compactação em silos, nos quais devido à combinação de um ambiente anaeróbico com baixo pH, torna-se seletivo ao

desenvolvimento de microrganismos desejáveis na fermentação, responsáveis pela elevação da qualidade da silagem (PAHLOW et al., 2003; SANTOS, 2012)

No processo de ensilagem, a junção de cada etapa contribui para a qualidade da silagem. A etapa de moagem é realizada para facilitar a compactação do material e disponibilizar para o meio os carboidratos solúveis. A compactação reduz os espaços entre as partículas do material, evitando que o oxigênio fique retido, e assim possa propiciar a proliferação de microrganismos indesejáveis. A vedação do silo cria uma condição de anaerobiose que é essencial para a fermentação (MOMBACH, 2014).

O processo fermentativo da ensilagem é dividido em quatro fases, onde fase aeróbica: a taxa de oxigênio está em níveis elevados, assim ocorre o favorecimento do crescimento de microrganismos que atuam na redução do oxigênio; fase de fermentação ativa: redução do pH, dada pela formação de ácidos graxos a partir dos açúcares, através da ação de bactérias heterofermentativas e enterobactérias, posteriormente predomina a ação de bactérias homofermentativas; fase de estabilidade: até a abertura do silo ocorre a manutenção do pH da silagem, onde há uma baixa taxa de bactérias homofermentativas; fase de descarga: ocorre após a abertura do silo, onde a silagem passa a ter contato com o oxigênio, o período de aerobiose favorece o crescimento de leveduras e na sequência de fungos, que atuam na degradação da silagem (SANTOS e ZANINE, 2006).

Segundo Pereira e Santos (2006) o processo de fermentação é muito complexo, sendo considerada uma metabiose, pois ocorre o desenvolvimento simultâneo e sucessivo de microrganismos de diversos gêneros e espécies que dependem principalmente do pH, do potencial de oxirredução e do tipo e quantidade de substratos presentes no meio

3.2 Perfil microbiológico da silagem

A microbiota da silagem exerce papel fundamental, atuando diretamente na qualidade e conservação da mesma. Basicamente, o perfil microbiológico da silagem pode ser dividido em dois grandes grupos de microrganismos, sendo eles favoráveis, onde seus produtos finais são essenciais para que a qualidade seja obtida, representado pelas bactérias do ácido lático (BAL) e bactérias do ácido propiônico (BAP). Os desfavoráveis por sua vez, podem atuar na degradação da silagem, seja ela (*Bacillus* spp., *Listeria* spp., e fungos) ou deterioração anaeróbica (*Clostridium* spp. e enterobactérias) (MOMBACH, 2014; OUDE ELFERINK et al., 1999; SANTOS, 2012).

3.2.1 Bactérias Ácido Láticas

As bactérias ácido láticas (BAL) são microrganismos gram-positivos, catalase negativos não formadoras de esporos. Os principais gêneros são *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* reconhecidamente interessantes para a preservação da forragem (McDONALD et al., 1991; PAWLOW et al., 2003).

Seu principal produto final da fermentação de açúcares é o ácido láctico porém, outros compostos também são produzidos, como ácido acético, etanol e dióxido de carbono (CO₂) (MUCK, 2010). Levando em consideração o metabolismo fermentativo dessas bactérias, elas podem ser classificadas como homofermentativas e heterofermentativas (NOVISKI, 2013).

Bactérias homofermentativas caracterizam-se pela produção de mais de 85% de ácido láctico a partir de hexoses, como glicose, porém não conseguem degradar pentoses, como xilose, por não possuírem a enzima fosfoquetolase mediadora desse processo de degradação de xilose (MUCK, 2010) Compreendem as espécies de BAL homofermentativas *Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *P. acidilactici*, *Lactobacillus* spp. e *Enterococcus faecium* (MUCK, 2010; ZOPOLLATO et al., 2009). Bactérias heterofermentativas produzem ácido láctico a partir de hexoses, e são capazes de fornecer pentoses a outros produtos, como o ácido acético. As heterofermentativas, por sua vez podem fermentar tanto hexoses como pentoses formando ácido láctico, ácido acético (ou etanol) e CO₂ (OUDE ELFERINK et al., 1999). Compreendem as espécies de BAL heterofermentativas são, por exemplo, *L. brevis*, *L. buchneri* e *Propionibacterium acidipropionici*, *Pediococcus cerevisiae* e *P. shermani* (MUCK, 2010; ZOPOLLATO et al., 2009).

3.2.2 *Bacillus*

Bactérias formadoras de esporos, gram-positivas e anaeróbias obrigatórias ou facultativas. Fermentam carboidratos em ácido láctico, acético e etanol, porém não apresentam importância na fase fermentativa da silagem. A maior atividade dos *Bacillus* se concentra na fase inicial de fermentação e logo após a abertura do silo (WOOLFORD, 1990).

O gênero *Bacillus* spp. está relacionado com o início da deterioração aeróbica de silagens (WOOLFORD et al., 1982). Dentro do silo, as porções mais próximas da superfície apresentam quantidades maiores de *Bacillus*, em relação as porções mais baixas, devido a maior condição anaeróbia dessas áreas (LINDGREN et al., 1985). As espécies *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. pumilus* são as principais encontradas em silagens (LI e NISHINO, 2011).

A preocupação com a presença destes agentes relaciona-se a deterioração, e também com os riscos à saúde humana e dos animais (VISSERS et al., 2007). A espécie *Bacillus cereus*, é considerada um importante contaminante do trato digestivo dos animais, capaz de produzir enterotoxinas, responsáveis por doenças sérias (PAHLOW et al., 2003).

3.2.3 Fungos filamentosos e leveduras

Fungos são microrganismos eucariotos e aeróbios obrigatórios. Os gêneros *Monascus*, *Geotrichum*, *Bissochlamys*, *Mucor*, *Monilia*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são os principais relacionados à deterioração da silagem (McDONALD et al., 1991).

Os fungos possuem a capacidade de produzir micotoxinas, que não são consideradas um grande problema para preservação da silagem dentro do silo, porém são motivos de grande preocupação em relação à saúde dos animais (WOOLFORD, 1990). Os problemas a saúde dos animais podem variar de redução da imunidade, problemas de fertilidade e distúrbios digestivos, além da contaminação de produtos de origem animal como o leite (OUDE ELFERINK et al., 1999).

Os fungos são classificados com base na sua estrutura e crescimento, são eles: fungos filamentosos: apresentam crescimento multicelular, denominado como hifas, que são de extrema importância para a sobrevivência e dispersão dos mesmos; leveduras: apresentam crescimento unicelular, célula em formato oval e se multiplica assexuadamente. No decorrer da fase anaeróbia os fungos filamentosos não proporcionam alterações na qualidade nutricional da silagem. Porém o contato com oxigênio, na fase pós-abertura do silo, permite a proliferação fúngica, podendo comprometer a qualidade do material (NOVISKI, 2013).

Do ponto de vista nutricional, segundo Garon e colaboradores (2006) os fungos se tornam indesejáveis por metabolizarem açúcares, lactato e celulose, que são importantes fontes energéticas para os ruminantes. No aspecto sanitário, a presença deles resulta na produção de micotoxinas ou esporos alérgicos, que são fatores de risco a saúde dos animais e humanos envolvidos na manipulação da silagem.

As leveduras são naturalmente encontradas no solo, plantas e água. É composta por gêneros classificados como aeróbios obrigatórios e anaeróbios facultativos, sendo a atividade de ambas consideradas indesejável, assim se faz necessário a controle tanto na fase anaeróbia quanto na fase pós-abertura (aeróbia). Na superfície de plantas os gêneros mais encontrados são: *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Torulopsis* (LINDGREN et al., 1985).

Na fase anaeróbia a atividade de leveduras tem importância em silagens com alta disponibilidade de carboidratos. A atividade desses microrganismos proporciona a elevação na produção de etanol, água e dióxido de carbono, que resulta em grandes perdas de MS (McDONALD et al., 1991; WOOLFORD, 1990).

Já na fase aeróbia esse grupo de microrganismos são um dos primeiros a se desenvolver, isso se deve ao fato de serem capazes de crescer em pH baixos cerca de 3,5. Em aerobiose utilizam como substrato o ácido láctico, promovendo o aumento do pH, e favorecendo o desenvolvimento de outros microrganismos deterioradores, que assim como eles propiciam a instabilidade aeróbia (WOOLFORD, 1984).

3.2.4 *Clostridium*

Os clostrídios são organismos gram-positivo, formadores de esporos e anaeróbios obrigatórios, que não se desenvolvem em ambientes com pH abaixo de 4,5 (McDONALD et al., 1991). Sua presença em silagens, normalmente é resultado de contaminação de solo ou aplicação de dejetos na lavoura, pois sua concentração em plantas é baixa (WOOLFORD, 1984).

As espécies mais encontradas em silagens são de dois tipos: sacarolíticos que são capazes de realizar a fermentação de açúcares e ácidos orgânicos, representados pelas espécies *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum*, e os proteolíticos que fermentam açúcar e aminoácidos, sendo responsáveis pela atividade proteolítica nas silagens, representados pelas espécies *C. sporogenes* e *C. perfringes* (NOVISKI, 2013).

Com a quebra de proteína ocorre a produção de amônia e aminas (ADESOGAN e QUEIROZ, 2009) resultando na redução do valor nutritivo da silagem e elevação das perdas de MS matéria seca (McDONALD et al., 1991). Na fase fermentativa, ocorre a produção de ácido butílico e compostos tóxicos (NOVISKI, 2013).

3.3 Inoculantes Bacterianos

Os aditivos mais comumente utilizados em silagens são os inoculantes bacterianos (MOMBACH, 2014). Estes atuam na melhoria do processo fermentativo, propiciando o crescimento de microrganismos benéficos a silagem, controle dos deterioradores e acidificação eficiente, promovendo uma adequada conservação da silagem (MORAIS, 2016).

Os inoculantes bacterianos contêm bactérias ácido láctico, que atuam na suplementação a esta mesma categoria, que são responsáveis pela produção de ácido láctico, resultando na rápida queda de pH, com eficiente fermentação do material ensilado (MUCK e KUNG JR, 1997).

Atualmente o enfoque da indústria de inoculantes é a busca por produtos à base de bactérias homofermentativas. Porém, a utilização de bactérias heterofermentativas vem crescendo, e mostra-se promissora em aumentar a estabilidade de silagens (ANDRADE, 2013).

Os inoculantes bacterianos utilizados como aditivos, são constituídos por bactérias homofermentativas, heterofermentativas, a combinação destas e, por vezes, a presença de enzimas celulolíticas ou proteolíticas (MOMBACH, 2014).

Uma ou mais espécies homofermentativas, como *L. plantarum*, *L. casei*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus spp.*, são comumente empregadas como inoculantes em silagens (MUCK, 2010). Estas cepas quando empregadas na silagem apresentam rápido crescimento e dominação da fermentação (MUCK e KUNG JR, 1997).

Com o avanço das técnicas de fermentação, tem surgido no mercado cepas liofilizadas e encapsulada de bactérias heterofermentativas, que incluem espécies como, *L. buchneri*, *P. cerevisiae*, *Propionibacterium shermani* e *P. acidipropionici* que reduzem os efeitos negativos da fermentação homolática (KUNG JR, 2009), uma vez que o ácido láctico é utilizado como substrato na deterioração aeróbia (MUCK e KUNG JR., 1997).

PAHLOW e HONIG (1994) sugeriram a utilização combinada de dois tipos de inoculantes bacterianos, para superar o problema de deterioração aeróbica de silagens, como espécies de *Bacillus* e bactérias produtoras de ácido propiônico. Espera-se que a junção desses dois grupos bacterianos seja capaz de produzir substâncias com propriedades antimicóticas, inibindo assim o crescimento de fungos após a exposição aeróbica.

Lactobacillus plantarum: bactéria homofermentativa, atua no controle da fermentação de silagens, devido sua eficiente produção de ácido láctico, que proporciona rápida redução do pH logo no início do processo fermentativo (FILYA, 2003).

Propionibacterium acidipropionici: bactéria heterofermentativas, produtora de ácido propiônico, atua na estabilidade aeróbica das silagens de milho (BOLSEN et al., 1996), com

alta umidade (DAWSON et al., 1998). O ácido propiônico atua eficientemente na redução de perdas associadas a instabilidade aeróbica (LINDGREN et al., 1983).

3.4 Uso de aditivos enzimáticos

A utilização de aditivos enzimáticos na dieta animal não possui função nutricional, porém auxiliam no processo digestivo melhorando a digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes presentes na dieta. A incorporação de enzimas como aditivos, tem sido utilizada com a intenção de melhorar o seu desempenho e rentabilidade (CAMPESTRINI et al., 2005).

Enzimas são proteínas globulares, que se apresentam com estrutura terciária ou quaternária, atuam como catalisadores biológicos ao aumentarem a velocidade de reações químicas no organismo, sem serem alteradas durante o processo (CHAMPE e HARVERY, 1989).

Com base na sua finalidade, as enzimas usadas na alimentação animal podem ser classificadas como: 1) enzimas que complementam quantitativamente as enzimas digestórias endógenas dos animais, são elas proteases, amilases e fitases e 2) enzimas complementares, aquelas que o organismo não possui capacidade de sintetizar e/ou sintetizam em pequenas quantidades, são elas β -glucanas, pentosanas e α -galactosidases (CAMPESTRINI et al., 2005).

A adição de enzimas exógenas, na alimentação animal propicia o aumento da disponibilidade de polissacarídeos de reserva, gorduras e proteínas que são protegidas pela atividade digestória, minimizam os efeitos negativos causados por fatores antinutricionais dos grãos, potencializam a atividade de enzimas endógenas e diminuem a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes (CAMPESTRINI et al., 2005; GUENTER, 2004).

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 tem sido pouco explorado. O amido é o componente mais utilizado nas dietas de bovinos de alta produtividade, a utilização de suplementos enzimáticos que atuam na digestão do amido no rúmen pode permitir a melhora na produtividade (TRICARICO et al., 2008).

3.4.1 Enzimas amilolíticas

Na primeira metade do século passado em decorrência do interesse industrial teve início a produção de enzimas amilolíticas, devido à produção de glicose a partir de materiais

amiláceos. As amilases têm por função, a hidrólise do amido em açúcares redutores, e são detectadas em grande variedade de materiais biológicos (HARGER, 1982).

As amilases são capazes de degradar a molécula de amido e seus produtos de hidrólise, até sacarídeos menores. Amplamente distribuídas na natureza, passou a ser produzida industrialmente tendo visto a vasta aplicação do amido e seus derivados (FREITAS, 2012). Esta entre as enzimas mais importantes industrialmente, apresentando importância biotecnológica nas mais diversas áreas (GUPTA et al., 2003).

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

As glucoamilases ou amiloglucosidases são exoamilases que hidrolisam ligações glicosídicas do tipo α -1,4 removendo sucessivas unidades de glicose a partir da extremidade não redutora da cadeia, liberando moléculas de D-glicose na conformação β . Também hidrolisam ligações α -1,6 e algumas ligações do tipo α -1,3, porém, em uma velocidade menor (MICHELIN et al., 2008; KUMAR e SATYANARAYANA, 2009).

Segundo Obel (2001) a amiloglucosidase é uma enzima utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo α -1,4 e α -1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois, sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose.

A endoenzima carboidrase, α -amilase possui atividade hidrolítica nas ligações α -1,4 em polissacarídeos dispersos em meio aquoso, com pelo menos, três resíduos de glicose na cadeia. Algumas α -amilases também hidrolisam ligações glicosídicas α -1,6, mas com eficiência reduzida (LÉVEQUE et al., 2000; SUVD et al., 2001).

A α -amilase se caracteriza por agir sobre a amilose e amilopectina. A conformação do complexo enzima-substrato formada é ideal para a catálise. Por não conseguir quebrar as ramificações, a hidrólise da amilopectina é limitada, fazendo com que resulte na produção de dextrinas limites ou oligossacarídeos, que possuem todos os pontos de ramificação. Senso assim faz-se necessário a utilização das amiloglucosidases, atuando na quebra das cadeias maiores (dextrinas) em glicose, na qual as α -amilases não atuam completamente. Vale ressaltar que a

concentração dessas enzimas deve ser suficiente, para que o processo de hidrólise não seja parcial (LÉVEQUE et al., 2000; SUVD et al., 2001).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Preparo da silagem

A silagem de grão reidratado de milho (DKB 395 genótipo) foi confeccionada entre os meses de abril e junho de 2016 no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II.

Após a colheita realizada na safra 2015/2016 os grãos de milho foram moídos para passar através de tela de 4 mm, em seguida adicionou-se água á ensilagem na proporção de 0,33 L/kg de milho moído e homogeneizados. Amostras previamente pesadas, foram tratadas com os aditivos enzimáticos testados. Oitenta e quatro mini silos foram utilizados em um delineamento inteiramente casualizado, composto pelos seguintes tratamentos: 1) Controle (CON) sem enzimas amilolíticas; 2) Glucoamilase (GLU), com 300 mL/t de matéria fresca 35,563 IU/ml (Kerazyme 4560, Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, RS); 3) α -amilase (α -AMI), com 300 mL/t de matéria fresca 49,473 IU/mL (Kerazyme 4577, Kera Nutrição Animal). Todos os tratamentos também foram inoculados com KeraSIL grão úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado. Os aditivos foram misturados na forragem fresca. A mesma quantidade de água foi adicionada a todos os mini silos. Os tratamentos foram fornecidos separadamente para cada mini silo para fornecer replicações verdadeiras. Os silos foram mantidos em local abrigado e armazenado em temperatura ambiente ($28,5 \pm 2,3^\circ\text{C}$).

Antes que os silos fossem fechados retirou-se uma amostra de 0,2 kg de cada tratamento, de diferentes locais dos silos (porção superficial, meio e inferior) e homogeneizadas para formar uma amostra composta, que foi encaminhada para análise de atividade enzimática no laboratório de enzimologia, pertencente à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA-UFGD). A amostra foi intitulada como t0. Durante o decorrer da fermentação anaeróbia da silagem, com um intervalo de tempo de 7 dias, foram retiradas amostras de 0,2 kg de cada tratamento, de diferentes locais dos silos (porção superficial, meio e inferior) e homogeneizadas para formar uma amostra composta, totalizando cinco diferentes tempos de análise enzimática, sendo eles t0, t7 t14, t21, e t28 dias. Após cada coleta, as amostras foram encaminhadas para análise no laboratório de enzimologia,

Após 35 dias de ensilagem, foram coletadas amostras de 0,2 kg de cada tratamento, de diferentes locais dos silos (porção superficial, meio e inferior) e homogeneizadas para formar uma amostra composta, que foi encaminhada para análise microbiológica no laboratório de microbiologia aplicada pertencente à Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA-UFGD), com base na quantidade de fungos filamentosos e leveduras, bactérias lácticas, bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas presentes nas amostras. Para análise de estabilidade usou-se como critério de avaliação, a quantidade de fungos filamentosos e leveduras presentes nas amostras após 2, 3, 4 e 5 dias de abertura dos silos, onde a silagem estava em contato com o oxigênio.

4.2. Análise enzimática

A análise da atividade enzimática foi realizada em cinco tempos (t) diferentes, cada tempo de análise representa a quantidade em dias, em que o material estava ensilado, sendo eles t7, t14, t21 e t28 no qual representam 7, 14, 21 e 28 dias respectivamente.

O primeiro passo da análise enzimática foi realizado com a extração enzimática. Para análise, pesou-se 5 g da amostra de silagem de grão reidratado de milho, com auxílio de uma proveta adicionou-se 50 mL de água destilada, mantida em temperatura aproximada de 18° C. Após uma leve maceração com bastão de vidro, a solução foi colocada em agitação em Shaker por 1 hora a 1000 rpm. Após a agitação, a solução foi filtrada e centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm. Descartou-se o pellet e coletou-se o sobrenadante resultante, sendo ele a solução enzimática, que posteriormente foi diluída 5x (800 µL de água destilada + 200 µL solução enzimática) e 10x (900 µL de água destilada + 100 µL solução enzimática) e armazenadas em tubos Falcon em freezer.

Para a análise de atividade enzimática, pesou-se 5 g de amido de milho, com auxílio de uma proveta adicionou-se 50 mL de tampão acetato de sódio e aqueceu-se 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 transferiu-se os tubos para o banho de ebulição por 10 minutos a 80° C. Assim que os tubos foram retirados do banho de ebulição foram colocados em banho gelado

por cerca de 3 minutos. Após a retiradas dos tubos de ensaio do banho gelado, adicionou-se 8 mL de água destilada em cada tubo, seguiu-se para leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

Os tubos de ensaio usados como controle não receberam a solução enzimática, porém passaram por todos os passos da análise enzimática.

4.3. Análise microbiológica

Para a análise microbiológica adaptou-se a metodologia do livro “Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água”, Livraria Varela Editora, 2010. Pesou-se 10g da amostra de silagem de grão reidratado de milho, transferiu-se para Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina, agitou-se em Shaker por aproximadamente 10 minutos. A partir desta suspensão bacteriana, obteve-se a diluição de 10^{-2} , retirando uma alíquota de 1 mL e adicionando em um tubo de ensaio contendo 9 mL de solução salina e homogeneizado em VORTEX, o processo foi repetido até a diluição de 10^{-6} .

Os meios de cultura e as técnicas utilizadas foram padronizados para cada microrganismo analisado.

Para análise de bactérias lácticas, realizou-se a técnica “pour plate” (método de plaqueamento em profundidade), o meio de cultura utilizado foi MRS (Ágar de Man Rogosa & Shape). A partir da diluição de 10^{-3} pipetou-se alíquotas de 1 mL e transferiu-se para placa de Petri identificadas e esterilizadas, em seguida adicionou-se o meio de cultura (MRS) com temperatura por volta de 44 a 46° C, realizou-se a homogeneização manualmente em movimentos circulares, o procedimento foi realizado em triplicadas. Repetiu-se todo o processo para as diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . As placas de Petri após o procedimento foram incubadas em estufa a 32° C por 48 horas.

Para análise de bactérias anaeróbias facultativas realizou-se a técnica de “pour plate” (método de plaqueamento em profundidade) e para bactérias aeróbias, realizou-se a técnica “drop plate” (método de plaqueamento em gotas) o meio de cultura utilizado foi PCA (Plate Count Ágar). Para a técnica de pour plate, a partir da diluição de 10^{-3} pipetou-se alíquotas de 1 mL e transferiu-se para placa de Petri identificadas e esterilizadas, em seguida adicionou-se o meio de cultura (PCA) com temperatura por volta de 44 a 46° C, realizou-se a homogeneização manualmente em movimentos circulares, o procedimento foi realizado em triplicadas. Repetiu-

se todo o processo para as diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . As placas de Petri após o procedimento foram incubadas em estufa a 34°C por 48 horas. No plaqueamento por “drop plate”, primeiramente adicionou-se meio de cultura (PCA) em placas de Petri identificadas e esterilizadas. Após a solidificação, com a ajuda de uma caneta vidrográfica, as placas foram divididas em dois setores (uma linha vertical) cada um correspondente a uma diluição onde, foram depositadas três gotas paralelas de 0,01 mL (triplicatas). O processo foi realizado para as diluições de $10^{-3}/10^{-4}$ e $10^{-5}/10^{-6}$. As placas de Petri após o procedimento foram incubadas em estufa a 34°C por 48 horas.

Para análise de fungos filamentosos e leveduras realizou-se a técnica de “spread plate” (método de plaqueamento em superfície) o meio de cultura utilizado foi BDA (Batata Dextrose Ágar). O meio de cultura foi adicionado em placas de Petri identificadas e esterilizadas. Após a solidificação, pipetou-se alíquotas de 0,1 mL a partir da diluição 10^{-3} , que foram espalhadas por toda a placa com alça de Drigalski, sendo realizado em triplicatas. Repetiu-se todo o processo para as diluições de 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} . As placas de Petri após o procedimento foram incubadas em estufa a 23°C por 5 dias.

Todas as análises acima citadas, foram realizadas no dia de abertura do silo. Após foi realizada análise de estabilidade aeróbia, onde utilizou-se a técnica de spread plate (acima citada) com meio BDA para análise de fungos filamentosos e leveduras. Cada análise de fungos filamentosos e leveduras, representa a quantidade em horas que o silo permaneceu aberto e a silagem sujeita a interferências microbiológicas e ambientais provindo do contato com oxigênio. Sendo eles 24, 48, 72 e 96 horas após abertura do silo.

4.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC 2004), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE.

Os dados foram analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + T_j + E_i(T_j) + e_{ij}$$

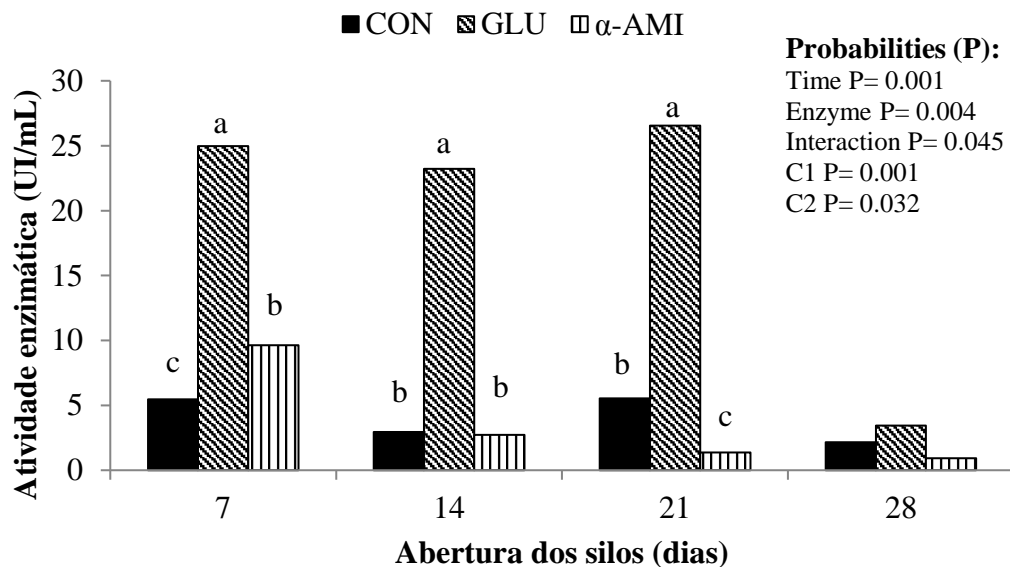
Onde: Y_{ij} = variável dependente, μ = média geral, E_i = efeito de enzima ($i = 1$ a 3); T_j = efeito aleatório de armazenamento ($j = 1$ a 4); $E_i(T_j)$ = efeito de interação. Os graus de liberdade foram corrigidos por DDFM = kr. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância

pelo comando PROC MIXED do SAS, versão 9.0 (SAS, 2009), adotando-se nível de significância de 5%. Foi realizado contrastes ortogonais para comparação entre os tratamentos onde: C1(controle vs enzimas) e C2 (GLU vs α -AMI).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir dos dados apresentados na figura 1, podemos observar que o tratamento GLU após 7, 14 e 21 dias (Tempo P= 0,001) de ensilagem diferiu-se estatisticamente dos tratamentos α -AMI e CON apresentando maior atividade enzimática. Após 7 dias de ensilagem o tratamento α -AMI diferiu-se estatisticamente, apresentando maior atividade enzimática quando comparada ao tratamento CON. Na análise realizada após 14 dias de ensilagem foi constatada que os tratamentos α -AMI e CON não diferiram entre si estaticamente. Após 21 dias de ensilagem o tratamento CON diferiu-se estatisticamente do tratamento α -AMI. Vale ressaltar que a análise realizada após 28 dias de ensilagem não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos GLU, α -AMI e CON.

Ilustração 1: Caracterização da atividade enzimática das enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI durante a ensilagem de grão úmido de milho.



Controle (CON), sem enzimas amilolíticas; Glucoamilase (GLU), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado; α -amilase (α -AMI), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado.

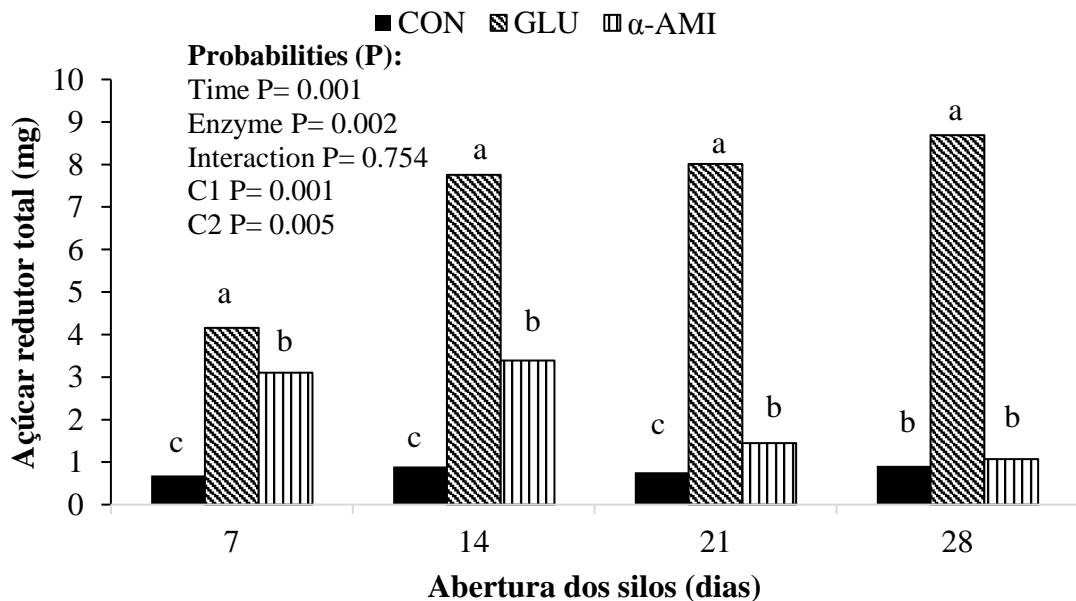
Pode-se observar que o tratamento GLU apresentou melhor desempenho (Enzima P= 0,004) quando comparado ao tratamento α -AMI. Apresentando-se mais ativo e estável durante o processo de ensilagem. Enquanto o tratamento α -AMI apresentou menor estabilidade e

atividade enzimática. Após 14 e 21 dias de ensilagem o tratamento α -AMI mostrou-se de igual ou menor desempenho na atividade enzimática quando comparada ao CON.

A glucoamilase utilizada no tratamento trata-se de uma exoamilase, capaz de hidrolisar ligações α -1,4 e α -1,6 do amido, liberando gradualmente unidades de glicose da extremidade não redutora do sacarídeo. A α -amilase utilizada no tratamento α -AMI trata-se de uma endoamilase, capaz de hidrolisar amidos complexos em cadeias de dextrina menores. As duas moléculas resultantes da atividade de hidrólise das enzimas testadas, são usadas como fontes de energia pelos microrganismos presentes na silagem de grão úmido de milho.

Com relação ao teor de açúcar redutor formado pela ação dos aditivos enzimáticos apresentado na figura 2, o tratamento GLU apresentou maior teor de açúcar redutor após 7, 14, 21 e 28 dias de ensilagem (Tempo P= 0,001), diferindo estatisticamente dos tratamentos α -AMI e CON. O tratamento α -AMI, diferiu (P < 0,05) do tratamento CON após 7, 14 e 21 dias de ensilagem. Já após 28 dias de ensilagem os tratamentos α -AMI e CON não diferiram (P < 0,05) entre si.

Ilustração 2: Caracterização da quantidade de açúcar redutor total, proveniente da hidrólise do amido realizada pelas enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI durante a ensilagem de grão úmido de milho.



Controle (CON), sem enzimas amilolíticas; Glucoamilase (GLU), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado; α -amilase (α -AMI), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus*

plantarum (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado.

O tratamento GLU (Enzima P= 0,002) apresentou um perfil crescente na disponibilidade de açúcar redutor total. Assim como na atividade enzimática, esse tratamento se mostrou estável e ativo durante o processo de ensilagem. O tratamento α -AMI em contrapartida, apresentou um perfil decrescente na disponibilidade de açúcar redutor quando comparada ao GLU. Chegando próximo ao fim do processo de ensilagem α -AMI apresentou resultados iguais (Interação P= 0,754) quando comparados ao CON.

O aumento da disponibilidade de glicose promovido pela ação da enzima glucoamilase, favorece o crescimento de bactérias lácticas, que são um dos primeiros microrganismos a se desenvolver na silagem. A disponibilidade de glicose livre também favorece a ação dessas bactérias, nas quais utilizam a glicose como matéria prima na produção de ácido lático, que por sua vez promove a diminuição do pH, inibindo o desenvolvimento de microrganismo patógenos.

Segundo Firkins et al (2006) a hidrólise de moléculas de amido realizada pela enzima α -amilase, libera moléculas de dextrinas, um carboidrato de baixo peso molecular. As dextrinas são degradadas por bactérias fermentadoras de carboidratos não-estruturais, e assim utilizadas como matéria prima na produção acetato. O acetato é o principal ácido graxo oriundo da digestão de fibras.

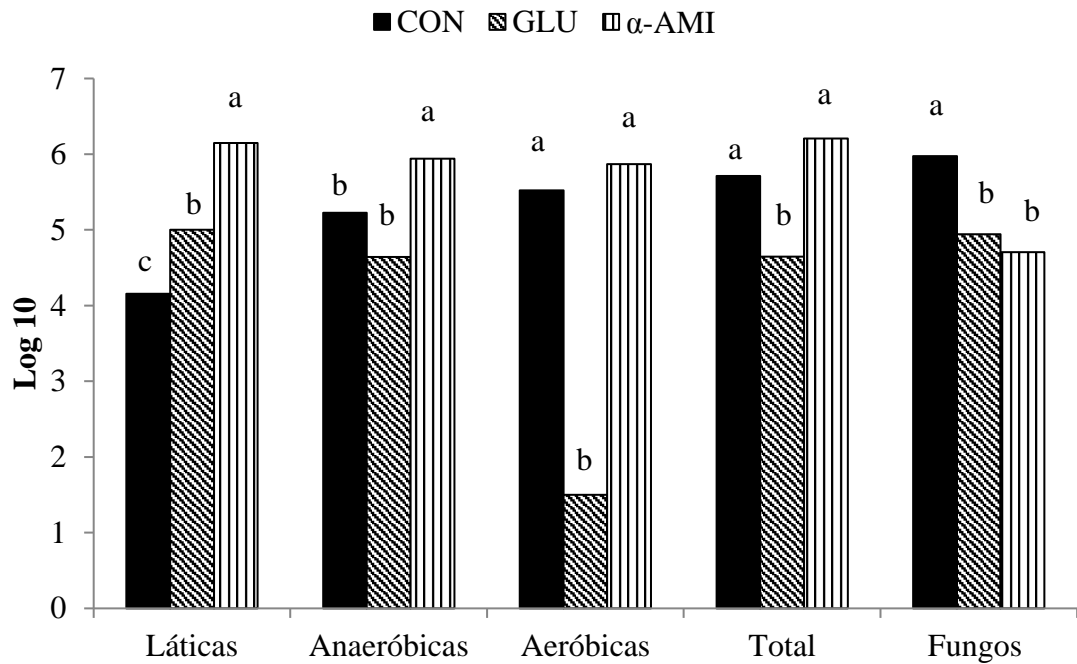
Os principais microrganismos fermentadores de carboidratos não-estruturais são, *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Lactobacillus sp.*, *Selenomonas ruminantium* (OLIVEIRA et al., 2007).

Com relação a influência das enzimas amilolíticas sobre a população bacteriana apresentada na figura 3, é possível observar que o tratamento α -AMI proporcionou o aumento na proliferação de bactérias lácticas quando comparada ao tratamento GLU e CON, porém o tratamento GLU apresentou maior proliferação de bactérias lácticas diferiu-se estatisticamente de CON. Para bactérias anaeróbias o tratamento α -AMI apresentou maior proliferação bacteriana diferindo-se estatisticamente de GLU e CON, porém os tratamentos GLU e CON não diferiram entre si.

O tratamento GLU apresentou a contagem mais baixa de bactérias aeróbia, enquanto os tratamentos α -AMI e CON não diferiram entre si estatisticamente. Na contagem de fungos

COM apresentou maior proliferação diferindo de GLU e α -AMI, porém GLU e α -AMI não diferiram entre si estatisticamente. Na contagem total de microrganismos α -AMI e CON apresentaram maior proliferação, quando comparada com CON.

Ilustração 3: Influência da inoculação das enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI na microbiologia da silagem de grão úmido de milho na abertura dos silos.



Controle (CON), sem enzimas amilolíticas; Glucoamilase (GLU), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado; α -amilase (α -AMI), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado.

De forma geral o tratamento α -AMI propiciou uma maior contagem de bactérias lácticas, assim como de anaeróbicas e aeróbicas, quando comparada ao tratamento GLU. Isso pode estar relacionado ao fato do tratamento apresentar menor atividade enzimática e disponibilidade de açúcar redutor, fazendo com que a proliferação bacteriana fosse mais intensa. O tratamento GLU que apresentou índices de atividade enzimática e disponibilidade de açúcar redutor maiores, mostrou uma menor proliferação de bactérias lácticas, anaeróbicas e aeróbicas.

Possivelmente o fato do tratamento GLU disponibilizar uma quantidade maior de glicose livre durante a fermentação da silagem, fez com que as bactérias diminuíssem sua multiplicação durante a ensilagem. Segundo Campiolo (2014) que testou diferentes inóculos preparados com inoculante comercial contendo *L. plantarum* e *P. acidipropionici*, a glicose

como fonte de carbono, quando em excesso pode prejudicar ou até mesmo diminuir a multiplicação de bactérias.

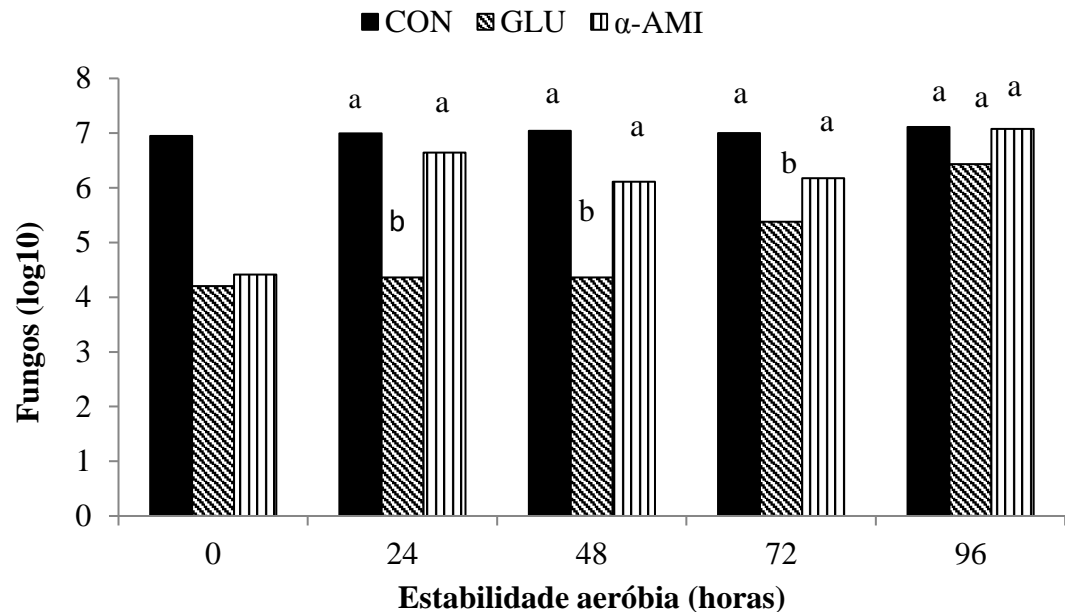
As bactérias lácticas são exigentes as condições de multiplicação, e bastante sensíveis a alterações no meio onde estão inseridas, assim os açúcares representam, as melhores fontes de carbono para estas bactérias (COELHO, 2011).

Os tratamentos GLU e α -AMI não diferiram entre si na contagem de fungos filamentosos e leveduras, apresentando índices menores que o tratamento CON. Mostrando a eficácia das enzimas amilolíticas testadas, na inibição desses microrganismos degradadores durante o processo de ensilagem.

Silva et al. (2010) ao avaliarem a influência do inoculante microbiano (*L. casei* e *Streptococcus faecalis*) e o complexo enzimático (α -galactosidase e β -mananase) sobre a microbiota da silagem de grão úmido de milho, observaram que a silagem inoculada apresentou quantidade de bactérias totais (7,4 UFC/g), valores superiores a este experimento, podendo evidenciar que o tratamento GLU exerceu efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias totais (4,6 UFC/g), quando comparado ao α -AMI (6,2 UFC/g).

Para análise de estabilidade aeróbia apresentada na figura 4, é possível observar que após 24, 48 e 72 horas os tratamentos CON e α -AMI apresentaram maiores scores porem não diferindo entre si, já o tratamento GLU apresentou scores mais baixos, diferindo estatisticamente entre CON e α -AMI. Análise após 96 horas nenhum dos tratamentos diferiram entre si estatisticamente.

Ilustração 4: Influência da inoculação das enzimas amilolíticas GLU ou α -AMI na estabilidade aeróbia da silagem de grão úmido de milho após a abertura dos silos.



Controle (CON), sem enzimas amilolíticas; Glucoamilase (GLU), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado; α -amilase (α -AMI), com 300 mL/t de matéria fresca e inoculante constituído por *Lactobacillus plantarum* (4×10^{10} UFC/g) e *Propionibacterium acidipropionici* (2.6×10^{10} UFC/g), adicionado na proporção de 4 g/t de milho moído hidratado.

Através da análise de estabilidade aeróbia é possível perceber que o tratamento GLU obteve um melhor desempenho na inibição de microrganismos degradadores até 72 horas após a abertura dos silos. Enquanto o tratamento α -AMI não se diferiu estaticamente do tratamento CON. Isso nos leva a crer que o tratamento GLU por apresentar maior atividade enzimática e disponibilidade de açúcar redutor, tem uma melhor ação na estabilidade aeróbia do que na proliferação bacteriana. O tratamento α -AMI não se diferiu do tratamento COM durante toda a análise de estabilidade aeróbia.

Vale ressaltar que somente após 96 horas de aerobiose os tratamentos GLU, α -AMI e CON, não apresentam diferenças estatísticas entre si, aumentando então o desenvolvimento de fungos filamentosos e leveduras. Mostrando a ação das enzimas amilolíticas sobre a estabilidade aeróbia, que até 72 horas atuou beneficemente na conservação da estabilidade, diminuindo o desenvolvimento de microrganismos deterioradores.

Dados significativamente melhores do encontrados por Jobim et al. (1997), que estudando a incidência de fungos e leveduras nas silagens de espigas e grãos úmidos de milho

em diferentes períodos de amostragem, constataram, que o desenvolvimento de leveduras e fungos nas respectivas silagens aumentou significativamente após 48 horas de abertura dos silos.

De uma forma geral observa-se que as silagens tendem a apresentar boa estabilidade aeróbia no período de 96 horas, o que pode ser devido a adequada conservação do material ou ainda as condições ambientais no momento de abertura dos silos com baixas temperaturas, pouco favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos deterioradores da silagem (TRES et al., 2014).

Muck (2004), avaliando os efeitos de inoculantes sobre a estabilidade aeróbia de silagens, registrou contagens de fungos e leveduras de 4,49 a 8,02 log (UFC), apresentando maior intervalo em relação aos valores obtidos no presente trabalho, que foram de 4,36 a 7,07 log (UFC)

Segundo Driehuis, Elferink e Spoelstra (1999), a aplicação de cepas homofermentativas de *L. buchneri*, isoladamente ou em associação com bactéria lácticas, promove a elevação da estabilidade aeróbia da silagem de milho reduzindo as populações de fungos filamentosos e leveduras.

Filya et al. (2004) a analisar o efeito de *P. acidipropionici* como inoculante bacteriano sobre silagens, observaram que esta espécie é eficiente na redução do número de leveduras e fungos de silagens, conseqüentemente, melhorando a sua estabilidade aeróbia

A utilização do inoculante contendo *L. plantarum* e *P. acidipropionici*, juntamente com as enzimas amilolíticas, podem ter determinado a melhora da estabilidade aeróbia, reduzindo a incidência de fungos e leveduras.

6. CONCLUSÃO

A utilização da enzima amilolítica α -Amilase, influenciou positivamente no aumento da proliferação de bactérias lácticas e anaeróbias. Atuando também na diminuição da incidência de fungos filamentosos e leveduras.

A enzima amilolítica Glucoamilase, influenciou positivamente na manutenção da estabilidade aeróbia. Diminuindo a incidência de fungos filamentosos e leveduras em até 72 horas após a abertura dos silos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADESOGAN, A.T., QUEIROZ, O.C.M. Silage pathogenicity and implications for the ruminant production chain. In: I International Symposium on Forage Quality and Conservation: 1., São Pedro, 2009. **Proceeding...** Piracicaba: FEALQ, p.225 -240, 2009.
- ANDRADE, L.P. **Silagem de grão de milho reidratado com soro de leite e água**. 51 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2013.
- BITENCOURT, L.L. **Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. 131 f. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção de Ruminantes). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- BOLSEN, K.K. et al. Effect of propionic acid bacterial inoculant on fermentation and aerobic stability of whole-plant corn silage. In: REPORT OF EXPERIMENTE STATION, 1996, Manhattan. **Anais.....**Manhattan: Kansas State University, p. 78-81, 1996.
- BUTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. 1.ed. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 430, 2002.
- CAMPESTRINI, E. et al. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.2, n.6, p.254-267, 2005.
- CAMPIOLO, R.S. **Ensilagem de grão úmido de milho utilizando inoculante microbiológico comercial e soro de queijo**. 2014. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2014.
- CANÇADO, R.A. **Avaliação microbiológica e micotoxicológica de grão de milho (*Zea mays* Linné) e soja (*Glycine max.* (Linné) Merrill) provenientes de cultivo convencional das sementes naturais e geneticamente modificadas**. 166 f. 2014. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos). Universidade do Paraná, Curitiba, 2004.
- CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. **Enzimas**. In: Bioquímica Ilustrada, 2 ed. São Paulo: Artes médicas, p.53-66, 1989.
- COELHO, L.F. **Isolamento e seleção de microrganismos e desenvolvimento de tecnologia para produção de ácido láctico**. 135 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.
- CORREA, C.E.S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, University of Wisconsin, Madison, v.58, n.11, p. 3008-3012, 2002.
- DAWSON, T.E.; RUST, S.R.; YOKOYAMA, M.T. Improved fermentation and aerobic stability of ensiled, high moisture corn with the use of *Propionibacterium acidipropionici*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 8, p. 1015-1021, 1998.
- DRIEHUIS, F.; ELFERINK, S.J.H.O.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop maize inoculates with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.87, n.4, p. 583-594, 1999.

FILYA, I. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. **Journal of dairy science**, Champaign, v.86, p.3575-3581, 2003.

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**, Turkey, v.97, p. 818-826, 2004.

FIRKINS, J.L.; HRISTOV, A.N.; HALL, M.B. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89 p.E31-E51, 2006.

FREITAS, P.R. Efeito de enzimas amilolíticas de *Aspergillus awamori* sobre a digestão do amido em bovinos. 52 f. 2012. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável). Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

FRENCH, D. Chemical and physical properties of starch. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.37, p. 1078-1058, 1973

GARON, D. et al.; Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage experimental study. **Journal Agriculture Food Chemical**. v.54, p.3479-3484, 2006.

GUENTER, S.P. **Practical experience with the use of enzymes** 2004. Disponível em <http://www.idre.ca/books/focus/821/chp6.html>. Acesso em: 22 de jun. 2017.

GUPTA, R. et al. Microbial α -Amylases: Biotechnological Perspective, **Process Biochemistry**, v. 38, p.1599-1616, 2003.

HARGER, C. SPRADA, D. HIRATSUKA, E. **Amilase** fúngica. In:Bioquímica das fermentações, [S.l.]: [s.n.], p. 56, 1982.

JOBIM, C. C. et al. Presença de microrganismos na silagem de grãos úmidos de milho ensilado com diferentes proporções de sabugo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 201-204, fev. 1997.

KUMAR, P.; SATYANARAYANA, T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.29, n.3, p.225-255, 2009.

KUNG JR., L. Effects of microbial additives in silages: facts and perspectives. In: ZOPOLLATTO, M.; MURARO, G.B.; NUSSIO, L.G. International symposium on forage quality and conservation, São Pedro, 2009. **Proceedings...**Piracicaba: FEALQ, v. 1, p.7-22, 2009.

LÉVÊQUE, E. et al. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, n.1, p.3-14, 2000. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TG13Y6Y51S1&user=972052&_coverDate=01%2F31%2F2000&_alid=1478499248&_rdoc=3&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=5241&_sort=r&_st=13&_docanchor=&view=c&_ct=115&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=594e5ad9ead7fe9e2d39680e2afda5a7&searchtype=a>. Acesso em: 22 jun. 2017

- LI, Y.; NISHINO, N. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability, and microbial communities in whole crop corn silage. **Grassland Science**. v.57, 4, p.184-191, 2011.
- LINDGREN, S. et al. Microbial dynamics during aerobic deterioration of silage. **Journal Science Food Agriculture**. v. 36, p.765-774, 1985.
- LINGREN, S. et al. Effects of inoculants, grain, and formic, acid on silage fermentation. **Swedish Journal of Agricultural Research**, Stockholm, v. 13, n. 2, p. 91-100, 1983.
- LUCCI, C.S. et al. Processamento de grãos de milho para ruminantes: Digestibilidade aparente e “*in situ*”. **Brazilian Journal of Veterinary Reserch and Animal Science**, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 35-40, 2008.
- McALLISTER, T. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in Farm Animal Nutrition**, Oxon: CABI Publishing, p.273-298, 2001.
- McDONALD, P et al. **The Biochemistry of Silage**. 2.ed. Marlow Bucks, UK: Chalcombe Publications, p. 340, 1991.
- 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.
- MOMBACH, M.A. **Silagem de grão de milho triturado e reidratado contendo glicerina bruta e inoculante microbiano**. 2014, 78f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Federal de Mato Grosso, Campus Universitário de Sinop, 2014.
- MORAIS, G. **A fermentação de grãos de milho reidratados influenciada pela aplicação de aditivos: aspectos da conservação e do valor nutritivo para vacas leiteiras**. Tese (Doutorado em Ciência animal e Pastagens) 112 f. 2016. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2016.
- MUCK, R. E.; KUNG Jr., L. Effects of silage additives on ensiling. In: **Silage: Field to Feedbunk**. New Yorkpg, p.187-199, 1997.
- MUCK, R.E. Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. **Trans. ASAE, St. Joseph**, v. 47, p. 1011-1016, 2004.
- _____. Silage microbiology and its control through additives. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.183-191, 2010.
- NOVINSKI, C.O. **Composição de micotoxinas e bromatologia de silagens de milho em silos de grande porte utilizando imagens em infravermelho**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) 85 f. 2013. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.
- NUSSIO, L.G. et al. Importância da qualidade da porção vegetativa no valor alimentício da silagem de milho. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS, 2001, Maringá. **Anais....** Maringá: UEM, p. 127-145, 2001.
- OBEL, L.B. Putting enzymes to work in bakery applications. **Cereal Foods World**, v.46, n.9, p.396-399, 2001.

OLIVEIRA, J.S. et al. Diversidade microbiana no ecossistema ruminal. **Revista Eletronica de Veterinaria**, v.8, n. 6, 2007.

OUDE ELFERINK, S.J.W.H. et al. **Silage Fermentation process and their manipulation**. In: ELETRONIC CONFERENCE ON TROPICAL SILAGE, 1999.

PAHLOW, G.; HONIG, H. The role of microbial additives in the aerobic stability of silage. In Workshop of the 15th General Meeting of the European Grassland Federation.. Wageningen, the Netherlands: Netherlands Society for Grassland Fodder Crops. **Proceeding...** p 149–151. 1994

PAHLOW, G. et al. Microbiology of ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage Science and Techonology**. 1 ed. Madison: American Society of Agronomy, p. 31-94, 2003.

PEREIRA, O.G.; SANTOS, E.M. Microbiologia e o processo de fermentação em silagens. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM. 3., Viçosa: UFV, 2006. **Anais...** Viçosa: UFV, p. 393-430, 2006.

SANTOS, A.O. **Seleção e avaliação de cepas bacterianas para ensilagem de milho**. 168 f. 2012. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SANTOS, E. M.; ZANINE, A. M. Silagem de gramíneas tropicais. **Colloquium Agrariae**, v. 2, n.1, p. 32-45, 2006.

SILVA, J.M. et al. Influência de inoculante bacteriano-enzimático sobre a microbiota e qualidade nutricional de silagens de grãos úmidos de milho. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.62-72, 2010.

SILVA, N. et al. **Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Agua**”, São Paulo – Livraria Varela Editora, 2010.

SIQUEIRA, G.R.; BERNARDES, T.F.; REIS, R.S. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: REIS, RA.; SIQUEIRA, G.R.; BERTIPAGLIA, L.M.A. **Volúmosos na produção de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: Funep, p. 25-60, 2005.

SUVD, D. et al. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. **Journal of Biochemistry**, v.129, p.461-468, 2001. Disponível em: <<http://jb.oxfordjournals.org/content/129/3/461.short>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

TRES, T.T. et al. Silagem de grãos de milho, com adição de soja: estabilidade aeróbia e desempenho de vacas leiteiras. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v.15, n.1, p.248-260, 2014

TRICARICO, J.M. et al. Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* a-amylase. **Animal Feed Science and Technology**, v. 145, p.136-150, 2008.

VISSERS, M.M. M. et al. Minimizing the level of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk. **Journal of Dairy Science**. v.90, p.3286-3293, 2007.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York, p. 305, 1984.

_____. The detrimental effect of air on silage. **Journal of Applied Bacteriology**. v.68, p.101-116, 1990.

WOOLFORD, M.K.; BOLSEN, K.K.; PEART, L.A.; Studies on the aerobic deterioration of whole crop cereal silages. **Journal of Agricultural Science**. v.98, p. 529–535, 1982.

ZOPOLLATTO, M.; DANIEL, J.L.P.; NUSSIO, L.G. Aditivos microbiológicos em silagens no Brasil: revisão dos aspectos da ensilagem e do desempenho de animais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.170-189, 2009.