



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DA
ENSILAGEM DO GRÃO DE MILHO REIDRATADO
ACRESCIDA COM ENZIMA AMIOLÍTICA:
VALOR NUTRICIONAL**

DANIELLE SABRINA MANGANELLI PEREIRA

Dourados - MS

Setembro-2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
CURSO DE ZOOTECNIA

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO DA
ENSILAGEM DO GRÃO DE MILHO REIDRATADO
ACRESCIDA COM ENZIMA AMIOLÍTICA: VALOR
NUTRICIONAL**

Acadêmica: Danielle Sabrina Manganelli Pereira

Orientadora: Andrea Maria de Araújo Gabriel

Coorientador: Jefferson Rodrigues Gandra

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Grande Dourados, como parte das exigências para obtenção do grau de bacharel em Zootecnia

Dourados-MS

Setembro-2020

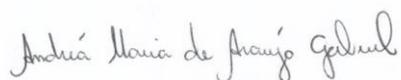
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Efeito do tempo de armazenamento da ensilagem do grão de milho reidratado acrescida com enzima amilolítica: valor nutricional

AUTOR: Danielle Sabrina Manganelli Pereira

ORIENTADOR(A): Andrea Maria de Araújo Gabriel

Aprovado como parte das exigências para a obtenção do grau de bacharel em **ZOOTECNIA** pela comissão examinadora.



Profa. Dra. Andrea Maria de Araújo Gabriel
(Orientadora)



Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
(Coorientador)



Msc. Orlando Filipe Costa Marques
Zootecnista

Data de realização: 18 de Setembro de 2020



Prof. Dr. Leonardo de Oliveira Seno
Presidente da comissão do TCC-Zootecnia

Dedico a Deus, minha família, professora Andrea de Araújo e professor Jefferson Gandra e aos meus amigos que me acompanha nessa jornada desde o início.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me conceder todos os dias o dom da vida, depois a minha família em especialmente minha mãe Soeli Manganelli por sempre me apoiar e fazer com que eu confiasse nas minhas decisões e escolhas, ao professore Jefferson Gandra por ser meu orientador desde o meu regresso à universidade, e a professora Andrea de Araújo por me aceitar como orientada para que eu pudesse realizar a apresentação do meu TCC e por ser sempre uma pessoa acolhedora e motivadora dentro da universidade, a Jamille por me conceder parte do experimento de mestrado, e as minha amigas que me ajudaram muito na etapa final Andressa Lorga e Briely Amanda e a minha querida avó por sempre estar rezando por mim e torcendo pelo meu sucesso.

Sumário

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS.....	5
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	10
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 <i>Importância do grão de milho</i>	13
2.2 <i>Processamento do grão de milho</i>	14
2.2.1 <i>Milho reidratado e ensilado</i>	15
2.2.2 <i>Perfil microbiológico da silagem</i>	16
A- Microrganismos desejáveis.....	17
B- Microrganismos indesejáveis	17
2.3 <i>Aditivos na alimentação animal</i>	19
2.3.1 Inoculantes na silagem de grãos	19
2.3.2 Enzimas na alimentação animal.....	20
A - Enzimas amilolíticas	21
3 OBJETIVO	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 <i>Preparo da silagem</i>	23
4.2 <i>Valor nutricional</i>	23
4.3 <i>Análise estatística</i>	24
5 RESULTADO E DISCUSSÃO	25
6 CONCLUSÃO	30
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação das enzimas amilolíticas.....	21
Figura 2. Teor de MS (g.kg^{-1} MS) ao longo do período experimental	26
Figura 3. Teor de amido (g.kg^{-1} MS) ao longo do período experimental.....	26
Figura 4. Regressão polinomial simples da $DivMS$ (g kg^{-1}) em relação ao tempo de armazenamento da silagem de grão de milho reidratado	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho	14
Tabela 2. População típicas de grupos bacterianos e fúngicos em plantas da ensilagem	17
Tabela 3. Microrganismos estudados como inoculantes em silagens	20
Tabela 4. Valor nutricional de acordo com os tratamentos experimentais	25

RESUMO

Em relação ao maior uso de inovações tecnológicas para a produção animal, a silagem de milho se transformou no principal volumoso de alto índice de uso no Brasil. No entanto, as propriedades que tornam o milho um alimento bastante utilizado na alimentação animal e o fundamental ingrediente na fabricação da silagem, o faz usando, na maioria das vezes, milhos dos híbridos cultivados no Brasil que contém alto vitreosidade, o que limita a sua digestibilidade. Sendo assim, os aditivos enzimáticos na alimentação animal têm sido usados com mais frequência. Objetivou-se com este experimento avaliar as ações das enzimas amilolíticas e o tempo de armazenamento sobre o valor nutricional da silagem de grão de milho reidratado. Foram usados 120 silos experimentais, distribuídos em 3 tratamentos: 1- COM (sem adição de enzima amilolítica); 2- α -AMI (α -amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 400 U.mL⁻¹); 3- GLU – (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U.mL⁻¹). Inoculante bacteriano - *Lactobacillus plantarum* 4x10¹⁰ UFC.g⁻¹ + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6x10¹⁰ UFC.g⁻¹ – foi adicionado a uma dose de 4 g.t⁻¹ de matéria fresca em todos os tratamentos. A cada 30 dias 05 silos de cada tratamento foram abertos até 240 dias de armazenamento. Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo programa PROC MIXED do SAS 9.3. Em grandes períodos de armazenamento, a utilização da amilase influenciou (P \leq 0,05) de forma negativa, aumentando as perdas de MS, amido, CNF, DIVMS e aumentou o acúmulo de PB, EE, lignina e EB. Assim o tempo máximo de utilização dos silos, nestas condições experimentais, foi de até 89 dias.

Palavras-chave: aditivo, amido, ensilagem.

ABSTRACT

In relation to the greater use of technological innovations for animal production, corn silage has become the main bulky of high use in Brazil. However, the properties that make corn a widely used food in animal feed and the fundamental ingredient in the manufacture of silage, make it using, most of the time, hybrid corn cultivated in Brazil that contains high vitreousness, which limits its digestibility. Therefore, enzymatic additives in animal feed have been used more frequently. The purpose of this experiment was to evaluate the actions of amylolytic enzymes and the storage time on the nutritional value of rehydrated maize grain silage. 120 experimental silos were used, distributed in 3 treatments: 1- COM (without amylolytic enzyme addition); 2- α -AMI (α -amylase, Kerazyme 3035, enzymatic activity 400 U.mL⁻¹); 3- GLU - (glucoamylase, Kerazyme 4560, enzymatic activity 300 U.mL⁻¹). Bacterial inoculant - *Lactobacillus plantarum* 4x10¹⁰ UFC.g⁻¹ + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6x10¹⁰ UFC.g⁻¹ - has been added to a dose of 4 g.t⁻¹ of fresh matter in all treatments. Every 30 days 05 silos of each treatment were opened up to 240 days of storage. The results were submitted to variance analysis by the SAS 9.3 PROC MIXED programme. Over long periods of storage, the use of amylase had a negative influence ($P \leq 0,05$), increasing losses of MS, starch, CNF, DIVMS and increasing the accumulation of PB, EE, lignin and EB. Thus, the maximum time of use of silos, under these experimental conditions, was up to 89 days.

KEYWORDS: 1. Additive. 2. Starch. 3. Silage.

1 INTRODUÇÃO

O grão de milho (*Zea Mays*) possui valor nutricional e econômico, considerando suas várias formas de utilização, indo de alimentação animal à indústria de fármacos (PAES, 2006).

A semente de milho possui alto teor de carboidratos (CHO), prevalecendo o amido, contendo também proteínas, óleos e vitaminas, em razão disso é muito utilizada para a alimentação animal como principal fonte de energia (OWENS *et al.*, 1997; ANDRADE, 2013).

A maior parte de cultivares de milho híbrido existente no Brasil contém alto valor vítreo, sendo classificado tipo duro (CORREA *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2004).

Para obter a maior digestibilidade do milho nas diversas partes do trato digestório, alguns procedimentos são feitos pelas fabricas de nutrição animal (LOPES, 2016). Um exemplo de processamentos é a ensilagem, que eleva a digestibilidade do amido, pelos meios da proteólise e tempo de armazenamento (BARON *et al.*, 1986; HOFFMAN *et al.*, 2011).

A ensilagem de grão de milho reidratado vem ganhando espaço no mercado, pois, esse método permite que milhos colhidos na fase de linha negra (35-38% MS) sejam utilizados (ARCARI *et al.*, 2015) como intuito de aumentar o valor nutritivo, mas é importante entender as características dessa fermentação (MORAIS, 2016).

Ainda com intenção de aumentar o aproveitamento dos alimentos pelos os animais, especialistas vem utilizando enzimas na nutrição dos mesmos. Esses compostos são elaborados pelos microrganismos exclusivos pelo meio de metabolização de nutrientes que estão aplicados no meio de cultivo, posteriormente ocorre a síntese e a secreção enzimática (GASHE, 1992; LEE *et al.*, 1998). Dependendo da origem dessas enzimas (fúngicas, bacterianas e leveduras), as condições edafoclimáticas são diferentes para poder intensificar a sua atividade, podendo ter diferentes graus de adaptação dependendo da sua umidade, pH, temperatura, quantidade de enzimas e substratos (AEHLE, 2004).

A quebra da cadeia do amido é feita pelas enzimas amilolíticas, mas isso só ocorre com o acompanhamento da água pela reação hidrolítica. As α -amilases, por exemplo, são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4 presentes na parte interna da molécula de amido, tendo como produto final os oligossacarídeos ramificados

de tamanho variados e as dextrinas. Fora as ligações α -1,4, encontra-se algumas α -amilases que são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,6 (PANDEY *et al.*, 2005) e para que alcance o ápice do seu desempenho com estabilidade é necessário a presença de Ca^{+2} para a conservação da enzima na sua formação ideal (SPIER, 2005).

As glucoamilases (glicoamilases; amiloglucosidase) são enzimas de ação extracelular que rompem as ligações α -1,4 a partir da extremidade não redutora liberando glicose (LIN *et al.*, 1993), elas são capazes de atuar sobre as ligações α -1,6 das ramificações da amilopectina (NOROUZIAN *et al.*, 2006). Essa enzima hidrolisa também as moléculas de maltose, dextrina e glicogênio atuando nas ligações α -1,3. De acordo com Zanin (1989), a origem da glucoamilase é essencialmente fúngica (*Aspergillus* e *Rhizopus*).

Desse modo estudos foram realizados sobre a hipótese da melhora do potencial digestivo da silagem do grão de milho reidrato com adição de aditivos enzimáticos amilolíticos e período de armazenamento, considerando a digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes na dieta, tendo como finalidade melhorar o desempenho e rentabilidade dos nutrientes disponíveis.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 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).

O avanço significativo no conhecimento de sua composição, o milho vem sendo estudado e melhorado geneticamente para que tenha o potencial de atender todos os seus produtos finais (PAES, 2006, 2008).

As colorações do grão de milho variam do amarelo, branco podendo chegar aos tons de preto e vermelho. Um grão individual pode pesar de 250 a 300 mg, em média, e sua formação média em base seca é 72% de amido, 9,5% proteínas, 9% fibras (maior parte do resíduo em detergente neutro) e 4% de óleo (PAES, 2006). O grão de milho contém uma camada chama de pericarpo (5% do grão), o pericarpo ou embrião é rico em proteínas (11% do grão) e o endosperma é composto de proteínas e amido (75 a 80% do grão) (BUCHANAN *et al.*, 2000). Outras percentagens dos constituintes do grão do milho podem ser verificadas, como as mencionadas por Watson (2005) apresentadas na tabela 1

Tabela 1. Percentagem do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho.

Fração	% grão	Amido	Lipídeos	Proteínas	Minerais	Açúcares	Fibras ou conteúdo celular
% da parte (base seca)							
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9	---
Gérmen	11	1,3	82,6	26	78,4	69,3	12
Pericarpo	5	0,6	1,3	2,6	2,9	1,2	54
Endosperma	82	98	15,4	74	17,9	28,9	---

Fonte: Adaptado de Watson (2005 *apud* PAES, 2006)

O principal carboidrato (CHO) do grão de milho é o amido, que constitui cerca de 70 a 80% da matéria seca (MS) (ZEOULA *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2004; ARCARI *et al.*, 2015).

O aspecto químico do grão e a constituição da matriz proteica em torno dos grânulos de amido também afetam o acesso das enzimas amilolíticas. Essas

propriedades podem prejudicar a digestibilidade dos nutrientes dos grãos, visto que está relacionada à vitreosidade (CHOCT *et al.*, 2001).

As zeínas que se encontra no endosperma do grão de milho é a principal proteína que compõe aproximadamente de 60 a 80% das proteínas totais (GIBBON e LARKINS, 2005). Os resultados apontam que a vitreosidade está relacionado ao teor de proteína do grão, devido aos corpos proteicos com alta síntese de zeínas que possibilitam um melhor empacotamento dos componentes do endosperma (PEREIRA *et al.*, 2008)

Além das composições do endosperma do milho, a forma do processamento também interfere na digestibilidade do amido (OWENS *et al.*, 1986; THEURER, 1986). Dessa forma os procedimentos realizados sobre o grão apontam vários benefícios, havendo melhorias na eficiência do uso dos nutrientes do alimento pelos microrganismos ruminais e pelo trato digestório (CORREA *et al.*, 2002; PEREIRA, 2012; ANDRADE, 2013).

2.2 Processamento do grão de milho

Na alimentação animal, o processamento dos grãos de milho é aplicado durante anos, tendo o intuito de melhorar o consumo e o aproveitamento dos alimentos, especialmente para os ruminantes (HALE, 1973; MARQUES, 2011), e pode ser estipulado como qualquer processo físico que altera a estrutura molecular original ou a composição física do grão (THEURER, 1986).

O aumento da umidade, temperatura e/ou pressão são feitos como processos no grão de milho para obter eficiência na digestibilidade ruminal, pós-ruminal e completo do amido (THEURER *et al.*, 1999; ZINN *et al.*, 2002; FERRARETTO *et al.*, 2013), uma vez que a maior exposição dos grânulos de amidos possibilita os processos enzimáticos de degradação e digestão pela microbiota ruminal (BEAUCHEMIN *et al.*, 1994).

Ha diferentes tipos de processamentos de grãos e estas podem ser denominadas processamentos a seco, como quebrar, moer, tostar e peletizar, e processamentos úmidos, sendo eles flocular, expandir e cozer sob pressão (HALE, 1973).

A quebra das partículas dos alimentos, além de permitir as enzimas acessar os elementos nutricionais, promove a melhora do acondicionamento e palatabilidade dos alimentos (POND *et al.*, 1995) e na degradação ruminal do amido, possibilita o aumento da energia fermentável no rúmen, podendo alterar a quantidade de proteínas microbiana

e ácidos graxos voláteis (NOCEK e TAMMINGA, 1991).

Porém, a maioria dos processos que ocorre com o milho que não utilizam calor, umidade e pressão, ou a combinação dos mesmos, tem poucos efeitos sobre a vitreosidade (ARCARI *et al.*, 2015).

Alguns estudos apontam que a zeína pode ser degradada no processo da ensilagem (PHILIPPEAU e MICHALET-DOREAU, 1998; JURJANZ e MONTEILS, 2005; DER BEDROSIAN *et al.*, 2012). As zeínas podem ser degradadas e/ou solubilizadas na ensilagem por ação das bactérias proteolíticas ou solubilizadas por compostos orgânicos gerados no processo fermentativos. Essa proteína é insolúvel em água ou líquido ruminal, mas pode ser solubilizada pelo ácido acético e ácido láctico (LAWTON, 2002) que são produtos da fermentação da ensilagem (ARCARI, 2017).

A ensilagem do milho em seu estágio de maturidade (35-38% MS) é uma alternativa para induzir a degradação da matriz proteica e a gelatinização do amido (HOFFMAN *et al.*, 2011). A proteólise é outro mecanismo de fermentação da silagem com alto teor de umidade, uma vez que induz a degradação das proteínas ocorrida pelas ações das enzimas das plantas ou pelas proteases (VIERSTRA, 1996).

Entretanto, a elaboração da silagem de grão de milho úmido pode demonstrar limitações operacionais e climáticas, portanto, alguns métodos podem ser utilizados, como a reidratação do milho colhido com alto teor de MS, a moagem do grão, que permitem a flexibilizar e viabilizar as limitações por falta de equipamentos que delimitam a colheita do milho em tempo ideal (BENTON *et al.*, 2005, ARCARI *et al.*, 2015).

2.2.1 Milho reidratado e ensilado

A ensilagem do milho reidratado permite o reumidecimento dos grãos até obter o teor de umidade adequado para a ensilagem (30-40% MS) (ANDRADE FILHO *et al.*, 2010), quantidade suficiente para que a massa fermente e se conserve no processo da ensilagem (DEFFOR *et al.*, 2006). Dentro desse padrão se encontra a melhor digestibilidade da MS e degradabilidade da proteína (BENTON *et al.*, 2005).

O procedimento de reconstituição do milho pode ser uma alternativa viável, trazendo benefícios aos pecuaristas (LOPES *et al.*, 2005). Os autores anteriores mencionam ainda que sistemas tradicionais de armazenagem do milho seco são predispostos a ataques de vários insetos e roedores.

A primeira etapa para a produção da silagem de milho de grão reidratado é a moagem bem fina e a adição de água (30%), obtendo a mistura homogênea, com aspecto pastoso que será colocada em silos posteriormente, por último é adicionado o inoculante para silagem e realização do processo de compactação e lacração do silo (FRANZONI, 2012).

Um processo fundamental para que se obtenha uma boa qualidade da silagem do grão de milho reidratado é a homogeneização da água ao grão moído. Caso esse procedimento seja feito de forma inadequada, a hidratação do milho será de má qualidade e pode resultar em perda do ensilado por crescimento de fungos (ANDRADE, 2013).

2.2.2 Perfil microbiológico da silagem

Inúmeros fatores podem influenciar na qualidade final da silagem, podendo ser o material ensilado, o processo de ensilagem e perfil fermentativo, que está relacionado com a capacidade tamponante, teores de CHO solúveis, MS e atividades microbianas (DRIEHUIS e VAN WIKSELAAR, 2000).

Algumas ordens típicas de microrganismos e suas frações na ensilagem estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 1. Populações típicas de grupos bacterianos e fúngicos em plantas antes da ensilagem

Grupo	População (UFC/g forragem)
Bactérias aeróbicas 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)

Os microrganismos são divididos em dois grandes grupos: A- microrganismos desejáveis, que são os produtos benéficos obtidos durante a fermentação e atua na manutenção da qualidade da silagem; e B- microrganismos indesejáveis, que agem na degradação da silagem (OUDE ELFERINK *et al.*, 1999; SANTOS, 2012;

MOMBACH, 2014)

A - Microrganismos desejáveis

As bactérias do ácido láctico (BAL), que crescem em situações de microaerófilia ou na forma aeróbica (KLEIN *et al.*, 1998), são representantes do principal grupo de bactérias que agem no processo fermentativo. Os gêneros principais que constitui este grupo relacionado a silagem são: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* e *Streptococcus* (PAHLOW *et al.*, 2003).

O principal produto da BAL é o ácido láctico e essa produção pode ser fragmentada em: -Homofermentativas: produzem praticamente só o ácido láctico ou - Heterofermentativas: elementos como o etanol, ácido acético e dióxido de carbono (CO₂) são produzidos (OUDE ELFERINK *et al.* 2001; PAHLOW *et al.*, 2003).

Algumas bactérias heterofermentativas produzem propionato, acetado e CO₂, sendo denominadas bactérias do ácido propiônico (BAP), e obtêm energia pela fermentação dos açúcares ou do ácido láctico (MOON, 1983). A formação desses compostos é feita através do consumo de CHO solúveis da forragem (MUCK, 2010), podendo gerar produtos gasosos, perda de MS e energia (BACH, 2015).

Os produtos do metabolismo das BAL agem reduzindo o pH da silagem para baixo de 4,0 e estando em pH baixo, os principais competidores da BAL, em condições anaeróbicas (enterobactérias, clostrídeos e *bacillus*), são inibidos (MUCK, 2010), e os produtos da BAP são eficientes em diminuir as perdas de produtos relacionados à instabilidade aeróbica, tendo como função a ação antifúngica, impedindo as bactérias de degeneração aeróbica (leveduras e fungos filamentosos) (DRIEHUIS *et al.*, 2001).

B - Microrganismos indesejáveis

Os microrganismos indesejáveis são oriundos das perdas fermentativas de todas as fases do processo da ensilagem, são relacionados à 1- degradação anaeróbica, que tem alto consumo dos nutrientes (Enterobactérias e os *Clostridium spp.*) e 2- degradação aeróbica, que são microrganismos que consomem os CHO's competindo com as BAL e as BAP, degradam as proteínas (fungos filamentosos, leveduras, *Bacillus spp.* e *Listeria spp.*). Estes microrganismos também são patogênicos, podendo contaminar animais e seres humanos que tiverem contatos com a silagem (McDONALD *et al.*, 1991).

As enterobactérias são anaeróbicas facultativas, gram-negativas (MOMBACH,

2014). Essas bactérias são competidoras com as BAL pelo açúcar e o seu produto final da fermentação é o ácido acético não o lático (MUCK, 2010). A enterobactéria é um indicativo de proteólise, que causa redução no valor nutricional da silagem e produzem compostos tóxicos que diminuem a aceitabilidade da silagem (McDONALD *et al.*, 1991).

Os clostrídeos são bactérias gram-positivas, esporulantes, anaeróbicas, quem fermentam açúcares, ácidos orgânicos ou proteínas (NETO, 2012). Seu aparecimento na silagem se dá por contaminação de solo (McDONALD *et al.*, 1991; MUCK, 2010) e sua proliferação é ocasionado devido à elevação de temperatura de estocagem (>30°C), teores baixo de MS (<30%), baixa quantidade de CHO e alto potencial de tamponamento (PITT, 1990). Uma silagem que apresenta clostrídeos tem como características baixos teores de MS, altas concentrações de ácido butírico (>5 g.kg⁻¹ MS) e elevados teores de amônia e amina (OUDE ELFERINK *et al.*, 1999).

As leveduras são microrganismos anaeróbicos, heterotrófico e eucariontes unicelulares. Sua ação no processo fermentativo da silagem são as perdas e a deterioração na abertura do silo (MCDONALD *et al.*, 1991; MUCK, 2010). Em silos fechados, onde há ausências de oxigênio, as leveduras fermentam os açúcares, obtendo como produtos finais: ácido butírico, ácido acético, H₂ e CO₂, e os aminoácidos, formando a amônia, aminas e CO₂, reduzindo a quantidade de CHO livres para as BAL e os valores nutritivos da forragem, como consequência menor ingestão do alimento pelos animais (MUCK, 2010).

Existem alguns fungos filamentosos que têm sido isolados das silagens que são os *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e o seu crescimento na silagem ocorre com a penetração de O₂ na fase de armazenamento ou abertura dos silos (EL-SHANAWANY *et al.*, 2005). Estes fungos filamentosos podem produzir micotoxinas e contaminar os animais (REIS *et al.*, 2008).

Os *bacillus* são bactérias aeróbicas facultativas formadoras de esporos (MOMBACH, 2014). Muck (2010) citou que a atuação dos *bacillus* ocorre depois da ação das leveduras e bactérias que formam o ácido lático, e tem como resultado a elevação do pH e temperatura no silo.

Alguns microrganismos da classe *Listeria* são encontrados nas silagens, são anaeróbicos facultativos (DRIEHUIS e OUDE ELFERINK, 2000) e o seu desenvolvimento e sobrevivência ocorre pelo grau de anaerobiose e pH da silagem (OUDE ELFERINK *et al.*, 2001).

Pelas ações negativas acometidas pelos microrganismos nos silos, a utilização de aditivos no processamento da ensilagem vem ganhando espaço no mercado, tendo como finalidade, inibir a evolução dos microrganismos aeróbios, diminuir o crescimento microrganismos anaeróbicos, disponibilizar nutrientes para o crescimento de microrganismos benéficos para a fermentação, melhorando os nutrientes e MS da silagem (KUNG JR *et al.*, 2003).

2.3 Aditivos na alimentação animal

O Decreto 76.986 de 06 de janeiro de 1976, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define aditivo como: substâncias intencionalmente adicionadas ao alimento, com finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades desde que não prejudique o seu valor nutritivo (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Nas silagens de grão úmido, a utilização de aditivos tem crescido desde a década de 90, tendo a busca pelo controle dos microrganismos decompositores, a estabilidade aeróbica, a melhora no processo fermentativo, obtendo uma conservação adequada para o produto final do alimento (MORAIS, 2016).

2.3.1 Inoculantes na silagem de grãos

As silagens de grão de milho, por terem elevados teores de ácido lático e CHO solúvel, oriundo do processo de fermentação, vem sendo utilizados como substrato para o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos, depois a abertura dos silos a silagem está susceptível à deterioração (SEBASTIAN *et al.*, 1996). O uso de culturas bacterianas, para melhorar a forma da fermentação durante o processo da ensilagem, foi reconhecido no século XX (RÊGO *et al.*, 2015).

Os microrganismos usados como inoculantes para ensilagem são divididos em dois grupos, conforme seu produto final formado pela fermentação, 1- homofermentativos: produzem bactérias do ácido lático (BAL) e 2- heterofermentativas: produzem bactérias do ácido propiônico ou orgânico (BAP) (WEINBERG e MUCK, 1996; RÊGO *et al.*, 2015).

Na Tabela 3, encontram-se alguns microrganismos que vêm sendo estudados como inoculantes em silagem, com relevância as classes *Lactobacillus* e *Propionibacterium*.

Tabela 2. Microrganismos estudados como inoculante em silagens.

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

Fonte: Rêgo et al. (2015)

Os *Lactobacillus* são bactérias gram-positivas, totalmente fermentativas, anaeróbias e de alta exigência nutricional (HAMMES e VOGEL, 1995). As *L. plantarum* tem a habilidade de estimular a acidificação da silagem e reduzir as fermentações secundárias, o que ocasiona menor perda da energia (ARCARI, 2017). As *L. buchneri* produz ácido acético, identifica a realização anaeróbica do ácido láctico e acético que realiza o efeito antifúngico (MOON, 1983).

Os *Propionibacterium* produzem ácido acético e propiônico ao longo da fermentação do CHO solúvel e do ácido láctico (MCDONALD *et al.*, 1991), em função disso, tem o controle da deterioração da silagem depois da abertura dos silos (MOON, 1983).

2.3.2 Enzimas na alimentação animal

As enzimas são substâncias orgânicas compostas por polímeros de aminoácidos, tendo como finalidade decompor moléculas compostas em unidades menores, por exemplo, o CHO em açúcares (SOARES *et al.*, 2010).

A aplicação de aditivos enzimáticos na alimentação animal não tem função nutricional, mas ajuda no processo digestivo aumentando a digestão e a disponibilidade dos nutrientes presentes na silagem. Com a intenção de aumentar o desempenho e a rentabilidade, essas enzimas possuem classificações, que são: - enzimas que complementam quantitativamente as enzimas digestórias endógenas dos animais: sendo as proteases, amilase e fitases, e - enzimas completares, estas são as que o organismo não é capaz de produzir, ou produz em baixa quantidade, como o β -glucanas, pentosanas e α -galactosidades (CAMPESTRINI *et al.*, 2005).

A - Enzimas amilolíticas

As amilases são divididas em dois grupos conforme a composição dos tipos de ligações que a hidrolisam: 1) endoamilase que catalisam de forma casual as hidrolises no interior da molécula de amido, formando ramos lineares de oligossacarídeos e 2) exoamilase que efetuam a hidrolise tendo início pelas extremidades não-redutoras, obtendo pequenos produtos finais (GRUPTA *et al.*, 2003). De acordo com Kulp (1975), as amilases podem ser classificadas em três grupos: α -amilase que rompem as ligações no interior do substrato (endoamilase); β -amilase que hidrolisam partes das extremidades não redutoras do substrato (exoamilase) e glucoamilase (amiloglicosidase) que disponibilizam partes da glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

A Figura 1 demonstra um esquema de identificação e classificação das enzimas amilolíticas.

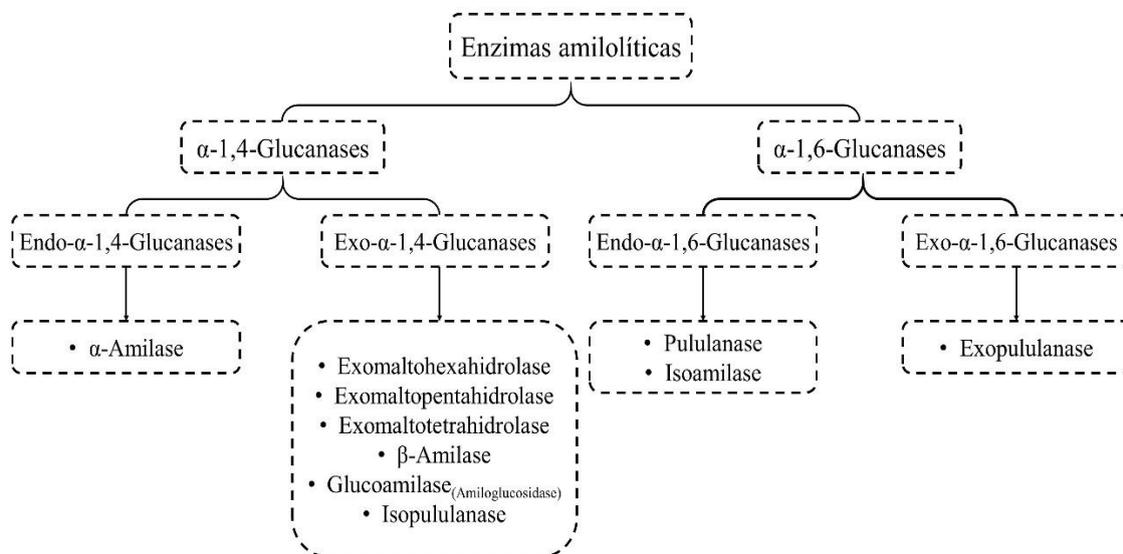


Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas

Adaptado de Nigam e Singh (1995)

Existem várias proporções de amilase microbianas disponíveis no mercado, tendo aplicações praticamente completas na hidrolise do amido, em indústria de processamento de amido (GUPTA *et al.*, 2003).

3. OBJETIVO

Objetivou-se com este experimento avaliar as ações das enzimas amilolíticas e o tempo de armazenamento sobre o valor nutricional da silagem de grão de milho reidratado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo da silagem

A silagem de grão de milho reidratado foi confeccionada no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencentes à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II.

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 a 4 mm, reidratados (30:100, litros de água e quilos de milho, respectivamente) e homogeneizados. Os silos experimentais foram feitos em baldes de polietileno de 40 cm de altura e 30 cm de diâmetro, e no fundo dos silos, foi colocado areia seca (2kg) 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 em três tratamentos: COM (sem enzima amilolítica); α -AMI (α -amilase, Kerazyme 3035, atividade enzimática 400 U.mL⁻¹); GLU (glucoamilase, Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U.mL⁻¹). Para cada tonelada de silagem confeccionada, 300mL de enzima comercial foram utilizadas. O inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4x10¹⁰ UFC.g⁻¹ + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6x10¹⁰ UFC.g⁻¹ – foi adicionado a uma dose de 4 g.t⁻¹ de matéria fresca em todos os tratamentos.

Antes do preparo dos silos, retirou-se uma amostra de cada tratamento (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).

Os silos foram selados e mantidos em local abrigado, sobre temperatura ambiente ao longo de 240 dias, sendo abertos 5 silos de cada tratamento a cada 30 dias.

4.2 Valor nutricional

Depois da abertura dos silos e as amostras coletadas, estas foram pesadas e colocadas em estufa de circulação forçada de ar por um período de 72h a 55°C para serem pré-secas, e após este período foram novamente pesadas, moídas a 1 mm, em

moinho de faca e armazenadas para determinar a matéria seca (MS, método 950.15), cinza (método 942.05), matéria orgânica (MO, MM-cinzas), proteína bruta (CP, N × 6.25, método 984.13) e extrato de etéreo (EE, método 920.39) (AOAC, 2000).

O amido foi determinado utilizando o método de Hendrix (1993) e as concentrações em carboidratos não-fibrosos (CNF) foram obtidos a partir da equação: $CNF = 100 - (\%PB + \%EE + \%cinzas + \%FDN)$ e a fibra de detergente neutro (FDN, sem sulfito de sódio), fibra de detergente ácido (FDA) e lignina (método do ácido sulfúrico) foram determinadas de acordo com Van Soest *et al.* (1991).

Uma amostra de cada tratamento foi utilizada para realizar a digestibilidade *in vitro* da MS segundo metodologia de Tilley e Terry (1963). A energia bruta foi obtida de através de bomba calorimétrica. O NDT foi obtido pela formula $NDT (\%) = dCNF + dPB + (dEE \times 2,25) + dFDN$, em que “d” representa a digestibilidade aparente dos diferentes componentes (NRC, 2001).

4.3 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; μ 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 σ_i^2 é a variância associada a cada tratamento. Os graus de liberdade foram corrigidos pelo método de Kenward e Roger (1997).

O efeito dos tratamentos foi decomposto em dois contrastes ortogonais: (1) os 2 tratamentos enzimáticos versus o controle; e (2) KERAZYME 3035 vs KERAZYME 4560. 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.

Para determinação do tempo ideal de abertura e/ou utilização dos silos foi realizada uma análise de regressão polinomial simples considerando apenas os tempos de abertura, através do PROC REG do SAS 9.3 considerando os pontos de abertura dos silos com nível de significância $P \leq 0,05$.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Foi observado o efeito significativo de enzima ($P \leq 0,021$; Tabela 4) para a MS, PB, EE, amido, carboidratos não fibrosos (CFN), lignina e a energia bruta (EB). Somente não foi obtido efeito de tempo ($P \leq 0,002$) para a lignina. O efeito da interação ($P \leq 0,041$) foi observado sobre a MS, MO, PB, EE, amido, lignina, cinzas e digestibilidade *in vitro*. Comparando os dois tratamentos enzimáticos ao controle, a inclusão de enzima diminuiu a MS, o amido, os carboidratos não fibrosos e a digestibilidade *in vitro* e aumentou a PB, o EE, a lignina e a energia bruta (C1; $P \leq 0,05$). Comparando α -AMI com GLU (C2; $P \leq 0,028$), a enzima α -AMI apresentou maiores valores para a MS e o amido.

Dos 30 aos 60 dias o teor de MS foi igual no controle e nos silos tratados com GLU e menores nos tratamentos com α -AMI. A partir dos 90 dias o teor de MS do controle se manteve superior. Entre os tempos 90 a 120 e 210 a 240, α -AMI e GLU tiveram valores iguais para esta variável (Figura 2).

O teor de amido, aos 30 dias, foi superior no controle (568,65 g.kg⁻¹ MS), seguido por GLU (534,94 g.kg⁻¹ MS) e por α -AMI (441,68 g.kg⁻¹ MS). Aos 60 dias α -AMI e GLU foram estatisticamente iguais e no tempo 120 α -AMI equiparou-se ao controle (606,57 g.kg⁻¹ MS e 622,79 g.kg⁻¹ MS). Entre os tempos 150 a 210 α -AMI foi o tratamento com os menores valores para o amido, chegando à igualdade nos tratamentos enzimáticos ao final do experimento (Figura 3).

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 89 dias (Figura 4).

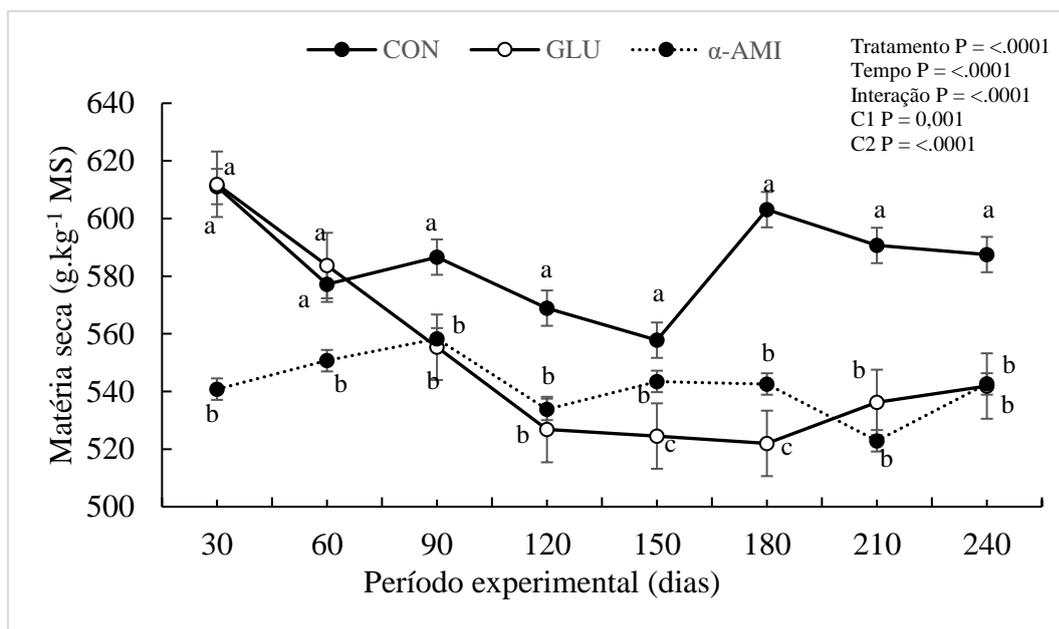
Tabela 4. Valor nutricional de acordo com os tratamentos experimentais

Item	Tratamentos ¹			EPM ²	Valor de P ³				
	COM	α -AMI	GLU		Enzima	Tempo	Interação	C1	C2
<i>g.kg⁻¹ 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	0,01	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 ⁴	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⁻¹ MS</i>									
EB	4,12	4,20	4,17	0,03	0,015	<,0001	0,796	0,007	0,261
ED ⁵	3,85	3,87	3,88	0,04	0,477	<,0001	0,320	0,923	0,226
EM ⁶	3,44	3,47	3,41	0,04	0,466	<,0001	0,314	0,909	0,219
EL ⁷	2,02	2,04	2,00	0,02	0,488	<,0001	0,311	0,946	0,232

¹COM (Controle), α -AMI (alpha-amylase Kerazyme 3035, atividade enzimática 400 U/mL), GLU (glucoamilase Kerazyme 4560, atividade enzimática 300 U/mL), ²EPM (erro padrão da média),

³Contrastes ortogonais C1 (COM vs GLU+ α -AMI); C2 (GLU vs α -AMI). ⁴Nutrientes digestíveis totais.

⁵Energia digestível. ⁶Energia metabolizável. ⁷Energia líquida.

**Figura 2** – Teor de MS ($g.kg^{-1}$ MS) ao longo do período experimental.

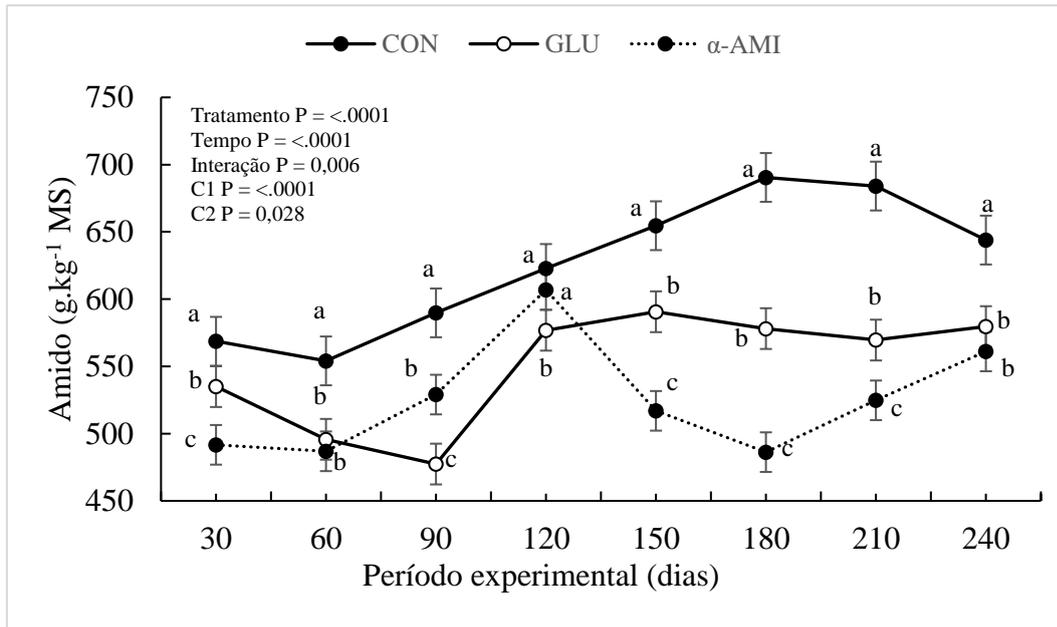


Figura 3 - Teor de amido (g.kg⁻¹ MS) ao longo do período experimental.

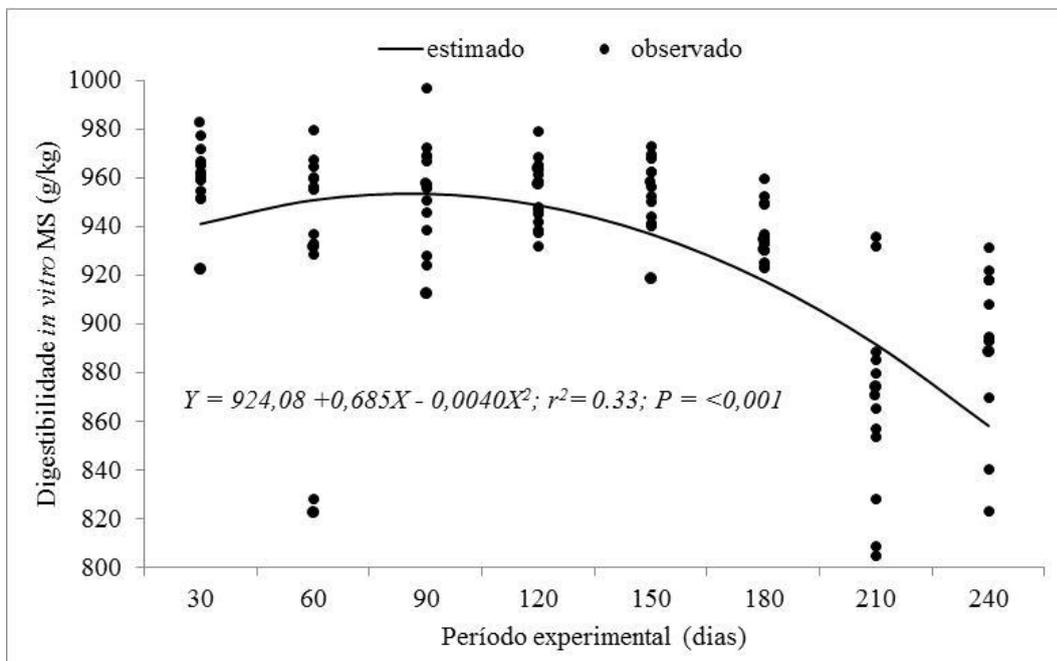


Figura 4 - Regressão polinomial simples da DivMS (g kg⁻¹) em relação ao tempo de armazenamento da silagem de grão de milho reidratado

Avaliando o valor nutricional das silagens, o controle apresentou maior quantidade de MS (585,35 g.kg⁻¹) logo após a silagem com α-AMI (550,28 g.kg⁻¹) e depois a silagem com GLU (541,89 g.kg⁻¹). Morais *et al.* (2012) citaram não encontrar efeito significativo no teor de MS utilizando aditivos enzimáticos bacterianos, já Ferraretto *et al.* (2015) obtiveram teor de MS maior no tratamento de milho de grão

seco do que nos grãos de milho que foram reidratados e ensilados ($P= 0.001$). Kung Jr *et al.* (2007) avaliando o inoculante *L. buchneri* ($6,6 \times 10^5$ UFC.g⁻¹), composto pelas enzimas β -glucanase (EC 3.2.1.78), α -amilase (EC 3.2.1.1), xilanase (EC 3.2.1.8) combinado com LB e ENZ ou a adição de um inibidor de bolor líquido à 0,1% (LMI), verificaram diferença significativa no teor de MS na silagem de milho de grão úmido em relação ao controle.

Foi observado que independentemente do tipo de aditivo enzimático adicionado na massa ensilada obteve redução no teor da MS (6,37% para α -AMI e 8,02% para GLU). A alteração no teor de MS provavelmente está ligada a perda de MS durante a respiração aeróbia ou a fase de fermentação (MCDONALD *et al.*, 1991). Oliveira *et al.* (2019) observaram que na adição da enzima amilolítica na ensilagem de milho reidratado aumentou o teor de MS na silagem. Lopes (2016), comparando a ensilagem controle com a que houve adição das enzimas amilolíticas (α -amilase e glucoamilase), verificou aumento no teor da MS de + 0,4% em contrapartida a glucoamilase diminuiu a MS em - 1,8%.

O menor teor de PB foi encontrado no tratamento controle, e resultados significativos foram encontrados nos tratamentos com adição de enzimas e no tempo de armazenamento, não tendo diferença entre os silos tratados com enzimas. Ferraretto *et al.* (2015) analisaram que o teor de PB do milho reidratado e ensilado foi maior que o milho de alta umidade.

A introdução de α -AMI e GLU ocasionou o aumento do teor de PB em 10,37% e 12,55% quando comparado às médias dos tratamentos dos controles. O que pode ser verificado a ação da enzima e o tempo de armazenamento, a solubilidade da enzima tenha modificado, resultando no aumento do seu teor, assim sendo, o consumo de CHO solúvel alterou a concentração de PB nos silos tratados.

Na comparação do teor de amido com a inclusão das enzimas e o controle, houve uma redução de 13,75% com a inclusão de α -AMI e 19,15%, de GLU, em conformidade com os resultados obtidos por Chen *et al.* (1995), que apontaram menor teor de amido embora os teores de MS, MO, PB e FDN fossem superiores mesmo tendo os tratamentos das enzimas amilolítica. Lopes (2016) encontrou uma significativa redução de amido induzido pela enzima GLU (-7,4%). A fermentação da silagem libera ácido lático e acético, as zeínas que constituem a matriz amido-proteína se solubilizam, com a proteólise que também é um mecanismo essencial da fermentação, que sucede na degradação de proteínas do endosperma (BARONet *et al.*, 1986).

Pode – se explicar a redução do amido no processo da ensilagem, porque há a presença de enzimas que são capazes de hidrolisar os componentes que constituem a parede celular, aumentam o substrato disponível para a fermentação láctica, o amido também sofre alterações pela acidificação, sendo capaz de apresentar maior degradação, formando glicose (KUNG JR *et al.*, 1993; CHEN *et al.*, 1994). A redução do amido está ligada à atividade enzimática, que torna o componente mais exposto para ser usados nas etapas de fermentação do silo.

6 CONCLUSÃO

Períodos muitos extensos de armazenagem e a incorporação das enzimas amilolíticas na silagem influenciaram nas perdas fermentativas, reduzindo os teores de MS, amido, carboidratos não fibrosos e a digestibilidade *in vitro*, aumentando os teores de PB, EE e EB. Assim conforme os dados obtidos neste experimento, o tempo máximo de utilização dos silos foi de até em 89 dias. Porém mais estudos são necessários para entender o desempenho das enzimas dentro dos silos e poder estipular um modelo de uso efetivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEHLE, W. **Enzymes in industry**, Wiley – VCH Verlag: Weinheim, 2004

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.

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 Association of official agricultural chemists. **Official Method of Analysis**. (17th ed), 2000.

ARCARI, M.A. **Efeito da vitreosidade, granulometria e inoculante bacteriano sobre a composição e qualidade de silagens de milho e sorgo reidratados**. 2017. 166f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Nutrição e Produção Animal, 2017.

ARCARI, M. A., MARTINS, C.M.M.R.; ALVES, B.G.; FONSECA, D.C.M.; ORSI, A.M.; TOMAZI, T.; GONÇALVES, J.L.; SANTOS, M.V. 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.

BACH, B. C. **perdas fermentativas, microbiologia e composição químico-bromatológica de silagens de milho**. 2015. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, 2015.

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.

BEAUCHEMIN, K. A.; MACALLISTER, T.A.; DONG, Y.; FARR, B.I.; CHENG, K.J. 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., KLOPFENSTEIN, T. ERICKSON, G.E. 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.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiology**, 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.

CHEN, K. H. HUBER, T.J.; SIMAS, J.; THEURER, C.B.; YU, P.; CHAN, S.C.; WU,Z.; SANTOS, F.; SWINGLE, R.S. 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.

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.

CHOCT, M.; BIRD, S.H.; LITTLEFIELD, R.; BALOGUN, R.; ROWE, J.B. Microstructure of grains as an indicator of nutritive value. **Animal Nutrition in Australian**, v. 13, p. 223-228, 2001.

CORREA, C. E. S.; SHAVER, R.D.; PEREIRA, M.N.; LAUER, J.G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, v. 85,N. 11, 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.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.; 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.; 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. 533–550, 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.

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.

GASHE, B. A. Cellulase production and activity by *Trichoderma* sp. A-001. Measurement of cellulase activity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1992.

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.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN B. Microbial α -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.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M.S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 3, p. 1081–1091, 2006.

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

HOFFMAN, P. C.; ESSER, N. M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.K.; SCOTT, M. P.; BODNAR, A.L.; SCHMIDT, R.J.; CHARLEY, R. C.. 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.

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.

KENWARD, M. G.; ROGER, I.H. Small sample interference for fixed effects from restricted maximum likelihood. *Biometrics*, v. 53, n. 3, p. 983–997, 1997

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUER, G. 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.; SCHMIDT, R.J.; EBLING, T.E.; HU, W. 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.

KUNG JR, L.; TAYLOR, C.C.; LYNCH, M.P.; NEYLON, J. M. 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.; CHEN, J.H.; KRECK, E.. KNUTSEN, K. 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.

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

LEE, B.; POMETTO, A. L.; DEMICI, A.; HINZ, P. N. Media evaluation for the production of microbial enzymes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46 p. 4775–4778, 1998.

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.

LOPES, A. B. R. DE C.; BIAGGIONNF, M.A.M.; BERTO, D.A.; SARTORI, J.R.; BOFF, C.E. 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.

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.

MORAIS, M. DA G.; ÍTAVO, C.C.B.F.; ÍTAVO, L. C. V.; BUNGENSTAB, D. J.; RIBEIRO, C. B. ; OLIVEIRA, L. B.; SILVA, J. A. 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.

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.

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

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

OLIVEIRA, E. R.; TAKIYA, C.S.; DEL VALLE, T.A.; RENNÓ, F.P.; GOES, R.H.T.B.; LEITE, R.S.R., OLIVEIRA, K.M.P.; BATISTA, J.D.O.; ARAKI, H.M.C.; DAMIANI, J.; SILVA, M.S.J., GANDRA, E.R.S.; PEREIRA, T.L.; GANDRA, J.R. 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.

OLIVEIRA, A. P. A. DE; SILVESTRE, M.A.; ALVES-PRADO, H.F.; RODRIGUES, A.; Marcelo Fossa da PAZ, M.F. DA; Gustavo Graciano FONSECA, G.G.; LEITE, R.S.R. 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.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; KROONEMAN, J.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F.; FABER, F. DRIEHUIS, F. 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.

OUDE ELFERINK, S. J. W. H.; DRIEHUIS, F.; GOTTSCHAL, J.C.; SPOELSTRA, S.F. Silage fermentation processes and their manipulation. IN: Electronic Conference on Tropical Silage, 1999. **Anais...Itália**: Food and Agriculture Organization (FAO),

1999.

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.; SECRIST, D.S.; HILL, W.J.; GILL, D.R. 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>. Acesso em: 4/10/2018, p. 1–5, 2008.

PAHLOW, G.; MUCK, R.E.; DRIEHUIS, F. Microbiology of Ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. (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**. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 2005. 760 p.

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, R.C.; DAVIDE, L.C.; PEDROZO, C.A.; CARNEIRO, N.P.; SOUZA, I.R.P.; PAIVA, E.. Relationship between structural and biochemical characteristics and texture of corn grain. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 2, p. 498-508, 2008.

PEREIRA, M. N.; VON PINHO, R.G.; BRUNO, R.G.S.; CALESTINE, G.A. 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.; 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. **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

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, R. A.; ALMEIDA, E.O.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; JANUSCKIEWICZ, E.R.; BERNARDES, T.F.; ROTH, A.P.T.P. 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.

SEBASTIAN, S.; PHILLIP, L.E.; FELLNER, V.; IDZIAK, E.S. 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.

SOARES, I. A.; FLORES, A.C.; ZANETTIN, L.; PIN, H.K.; MENDONÇA, M.M.; BARCELOS, R.P.; TREVISOL, L.R.; CARVALHO, L.D.; SCHAUREN, D.; ROCHA, C.L.M.S.C.BARONI, S. Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010.

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

THEURER, C. B.; HUBER, J.T.; DELGADO-ELORDUY, A.; WANDERLEY, R. 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.

THEURER, C. B. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 5, p. 1649–1662, 1986.

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.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Foreign Agricultural Service (FAS): production and distribution**. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/app/index.html#app/advQuery>>.

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.

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.

ZEOULA, L. M.; MARTINS, A.S.; PRADO, I.N.; ALCALDE, C.R.; BRANCO, A.F.; SANTOS, G.T. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 898–905, 1999.

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.