



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

PROTEASE E AMILASE EM SILAGEM DE MILHO REIDRATADO NA NUTRIÇÃO DE
RUMINANTES

JAMILLE DÉBORA DE OLIVEIRA BATISTA RODRIGUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia – Área de Concentração: Produção
Animal, como parte das exigências para obtenção do
título de doutor (a) em Zootecnia.

DOURADOS – MS

2022



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

PROTEASE E AMILASE EM SILAGEM DE MILHO REIDRATADO NA NUTRIÇÃO DE
RUMINANTES

JAMILLE DÉBORA DE OLIVEIRA BATISTA RODRIGUES

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia – Área de Concentração: Produção
Animal, como parte das exigências para obtenção do
título de Doutor (a) em Zootecnia

DOURADOS – MS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R696p Rodrigues, Jamille Debora De Oliveira Batista

Protease e amilase em silagem de milho reidratado na nutrição de ruminantes [recurso eletrônico] / Jamille Debora De Oliveira Batista Rodrigues. -- 2023.

Arquivo em formato pdf.

Orientador: Jefferson Rodrigues Gandra.

Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal da Grande Dourados, 2022.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

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

1. amido. 2. enzima exógena. 3. estabilidade. 4. degradabilidade. 5. consumo. I. Gandra, Jefferson Rodrigues. II. 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.

PROTEASE E AMILASE EM SILAGEM DE MILHO REIDRATADO NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

por

JAMILLE DÉBORA DE OLIVEIRA BATISTA RODRIGUES

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de DOUTOR (A) EM
ZOOTECNIA

Aprovado em: 13/12/2022

Documento assinado digitalmente
 JEFFERSON RODRIGUES GANDRA
Data: 06/01/2023 13:28:09-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Jefferson Rodrigues Gandra
Presidente/orientador
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
 RAFAEL HENRIQUE DE TONISSI E BUSCHINE
Data: 06/01/2023 12:51:53-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. Dr. Rafael Henrique de Tonissi e
Buschinelli de Goes
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
 ERIKA ROSENDO DE SENA GANDRA
Data: 13/12/2022 11:24:55-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Erika Rosendo de Sena Gandra
Membro Titular Interno
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
 NARA REGINA BRANDAO CONSOLO
Data: 23/12/2022 11:37:55-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Nara Regina Brandão Cômulo
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

Documento assinado digitalmente
 ANDREA KRYSTINA VINENTE GUIMARAES
Data: 13/12/2022 19:19:24-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof.^a Dr.^a Andréa Krystina Vinente
Guimarães
Membro Titular Externo
(Participação Remota)

BIOGRAFIA DO AUTOR

Jamille Débora de Oliveira Batista Rodrigues. Filha de Djenane Rubia de Oliveira e Jarinaldo Nobre Batista, nascida em 11 de maio de 1994 na cidade de Santarém-PA. Concluiu o ensino médio em 2010 e em 2012 ingressou no curso de Graduação em Zootecnia pela Universidade Federal do Oeste do Pará, *Campus Santarém*, onde concluiu o curso em 2017. Neste mesmo ano, iniciou as atividades como aluna no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal da Grande Dourados. No programa, foi bolsista Capes entre fevereiro de 2018 e março 2019, ano em que concluiu o curso com a defesa da dissertação. Ainda em 2019, ingressou no curso de doutorado na mesma instituição.

*Dedico esta conquista a minha família. Em especial,
aos meus filhos – Arthur e Miguel.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida, por estar sempre ao meu lado e me manter firme nessa jornada.

Aos meus pais, Djenane e Jarinaldo, pelo amor incondicional. Por sempre acreditarem em mim e por toda a confiança que depositam nos meus projetos.

A minha irmã, Fernanda, que foi a minha “porção de casa”. Estávamos a mais ou menos 3.000 km longe de casa, mas determinadas a alcançar nosso objetivo. Logo que o curso de doutorado começou, descobrimos que o Arthur estava a caminho, e você foi muito cuidadosa com a gente durante esse período.

Ao meu marido, Ricardo. Que sempre acreditou em mim e que nunca me deixou desanimar. Quando eu achava difícil demais, pesado demais, ele estava ali com as palavras certas e com todo o seu amor e apoio.

Ao meu querido amigo, Sullyvan. Que nunca me abandonou, nem mesmo nas coletas bem cedinho depois de passar a noite em claro em qualquer festa que fosse... Sempre preocupado, sempre prestativo, sempre amigo. E as queridas Larissa Braganholo e Isabelle Nóia, desde caronas a mão de obra nas coletas e análises, ou por compartilharem palavras de apoio e por todo carinho e cuidado comigo e com Arthur. Obrigada por tudo!

A família do coração que Dourados me apresentou, vocês foram um grande refúgio nos momentos de saudade de casa – Andrei, Anderson, Isabelle, Juninho, Larissa, Lu, Nara, Sullyvan – teria sido muito mais difícil finalizar essa etapa sem vocês.

Ao meu orientador, Jefferson Gandra, por toda sua competência e por dividir comigo um pouco da sua sabedoria. Ele é o cara que resolve tudo, super querido por seus alunos e se tornou para mim uma grande referência. Mas acima de tudo, agradeço por ter sua amizade hoje e por seguir me incentivando... não deixou de me apoiar e nem de acreditar que chegaríamos ao final desse longo capítulo.

A todos os professores do programa de pós-graduação, pelo conhecimento compartilhado. Em especial ao Dr. Rafael, Dr. Mábio e Dr. Euclides pelas orientações e auxílios.

Várias pessoas foram essenciais para que o experimento fosse executado e as análises concluídas. Eu não teria conseguido sem a ajuda de vocês – Bianca, Bruna, Cibeli, Gabrieli, Giovani, Hayne, Isabelle, Janaina, Juninho, Kélen, Mayra, Nara, Nathálie, Orlando, Raquel, Samuel, Sullyvan, Tamiris Santos, Thamiris Gonçalves. Do fundo do coração – Muito obrigada por todo apoio e parceria!

A todos, familiares e amigos, que direta, ou indiretamente estiveram comigo nessa caminhada. Vocês foram fundamentais para que eu chegasse até aqui, muito obrigada! Tem um pedacinho de cada um na minha formação pessoal e profissional.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO	20
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
Características do milho	21
Milho reidratado e ensilado	23
Adição de enzimas à nutrição de ruminantes	25
Amilases	28
Protease	32
Digestibilidade do amido de silagem de grão úmido mais adição de enzimas ...	34
3. HIPÓTESE	35
4. OBJETIVO	36
Geral	36
Específicos	36
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

CAPÍTULO II

1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS	51
Experimento 1	51
Preparo da silagem	51
Valor nutricional	52
Perdas fermentativas	52
Estabilidade aeróbia	53
Análise microbiológica	54
Perfil fermentativo	55
Cinética de degradação ruminal da matéria seca	56
Análise estatística	57
Experimento 2	58
Animais, instalações e dietas	58
Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes	59
Fermentação ruminal	60
Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana	60

Análise estatística Experimento 2.....	61
3. RESULTADOS.....	62
Valor nutricional.....	62
Perdas fermentativas.....	62
Estabilidade aeróbica.....	63
Perfil microbiológico e fermentativo.....	64
Cinética de degradação ruminal da matéria seca.....	65
Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes	65
Fermentação ruminal	65
Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana	66
4. DISCUSSÃO.....	66
Valor nutricional.....	66
Perdas fermentativas.....	67
Estabilidade aeróbica.....	67
Perfil microbiológico e fermentativo.....	68
Cinética de degradação ruminal da matéria seca.....	70
Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes	70
Fermentação ruminal	71
Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana	72
5. CONCLUSÃO	72
6. REFERENCIAS	72

CAPITULO III

1. INTRODUÇÃO	99
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	101
Experimento 3	101
Preparo da silagem.....	102
Valor nutricional.....	103
Perdas fermentativas.....	103
Estabilidade aeróbia.....	104
Análise microbiológica.....	105
Perfil fermentativo	106
Cinética de degradação ruminal da matéria seca.....	106
Análise estatística	107
Experimento 4	109
Animais, instalações e dietas	109

Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes	110
Fermentação ruminal	110
Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana	111
Análise estatística.....	112
3. RESULTADOS.....	113
Valor nutricional.....	113
Perdas fermentativas	113
Estabilidade aeróbica.....	114
Perfil microbiano e fermentativo	115
Cinética de degradação ruminal da matéria seca.....	115
Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes	115
Fermentação ruminal	116
Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana	116
4. DISCUSSÃO.....	116
Valor nutricional.....	116
Perdas fermentativas	117
Estabilidade aeróbica.....	118
Perfil microbiano e fermentativo	119
Cinética de degradação ruminal da matéria seca.....	119
Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes	120
Fermentação ruminal	120
Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana	121
5. CONCLUSÃO	121
6. REFERÊNCIAS	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMI – Alfa-amilase
AGCR – Ácidos graxos de cadeia ramificada
AGTotais – Ácidos graxos totais
BAL – Bactérias do ácido láctico
CHO - Carboidratos
CNF – Carboidratos não fibroso
CO₂ – Dióxido de carbono
CONT - Controle
EE – Extrato etéreo
FDA – Fibra de detergente ácido
FDN – Fibra de detergente neutro
g - Gramas
kg – Quilogramas
mg – Miligramas
ml - Mililitro
Mmol - Milimol
MN – Matéria natural
MO – Matéria orgânica
MS – Matéria seca
N-NH₃ – Nitrogênio amoniacal
PB – Proteína bruta
PROT - Protease
VN – Valor nutricional

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Percentual do constituinte total indicado nas estruturas físicas específicas do grão de milho	22
Tabela 2 - Classificação das enzimas.....	27

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes e composição química da ração	81
Tabela 2 - Composição bromatológica no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais	82
Tabela 3 - Perdas fermentativas em função dos tratamentos experimentais	83
Tabela 4 - Perfil microbiano e fermentativo no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais	88
Tabela 5 - Degradabilidade das silagens experimentais	89
Tabela 6 - Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de acordo com as dietas experimentais	90
Tabela 7 - Fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais	91
Tabela 8 - Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais	92
Tabela 9 - Coeficientes de regressão e pontos ótimos de inclusão de protease (CIBENZA DP100) em silagem de grão úmido de milho reidratado	93

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes e composição química da ração	131
Tabela 2 - Composição bromatológica no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais	132
Tabela 3 - Perdas fermentativas em função dos tratamentos experimentais	133
Tabela 4 - Perfil microbiano e fermentativo no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais	138
Tabela 5 - Degradabilidade das silagens experimentais	139
Tabela 6 - Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de acordo com as dietas experimentais	140
Tabela 7 - Fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais	141
Tabela 8 - Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais	142

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas.....	30
--	----

CAPÍTULO II

Figura 1- Diferença da temperatura do ambiente e silos experimentais de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	84
Figura 2- pH de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	85
Figura 3- População de fungos e mofos de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	86
Figura 4- População de leveduras de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	87

CAPÍTULO III

Figura 1- Diferença da temperatura do ambiente e silos experimentais de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	134
Figura 2 - pH de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	135
Figura 3- População de fungos e mofos de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	136
Figura 4- População de leveduras de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio.....	137

RESUMO GERAL

Inclusão de enzimas protease e amilase em silagem de grão úmido de milho reidratado na nutrição de ruminantes.

RODRIGUES, Jamille Débora de Oliveira Batista; Orientador: Dr. GANDRA, Jefferson Rodrigues.

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição de protease e amilase em silagem de grão úmido de milho reidratado. Foram realizados quatro experimentos, divididos em dois capítulos. O capítulo II contempla o *Experimento 1* e 2. No *Experimento 1*, 30 silos experimentais foram preparados e durante 45 dias ficaram vedados. Os silos foram distribuídos aleatoriamente em 5 tratamentos: 0 (controle), 250, 500, 750 e 1000g de protease por tonelada de milho reidratado (CINBENZA DP100®, extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). Além das enzimas, foi adicionado o inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4×10^{10} g/UFC + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6×10^{10} g/UFC – a uma dose de 4 g/t de matéria fresca em todos os silos. Foram avaliados o valor nutricional, as perdas fermentativas, a estabilidade aeróbica, perfil microbiológico e fermentativo e a cinética ruminal em todos os silos. No *Experimento 2*, 5 ovinos mestiços foram alojados em gaiolas metabólicas em delineamento em quadrado latino 5x5. Durante 70 dias, os animais consumiram silagem produzida de acordo com os tratamentos do Experimento 1. Além das silagens experimentais, os animais recebiam feno e uma mistura proteica mineral. Foram avaliados o consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes, a fermentação ruminal e o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana. Comparando os tratamentos enzimáticos ao controle, foi possível observar que a inclusão de enzima aumentou a composição da MS, PB e do amido e reduziu o FDN. A inclusão de protease diminuiu as perdas e aumentou a recuperação. Com relação a temperatura ambiente, esta reduziu nos tratamentos controle, 250 e 500 (g/ton). Os tratamentos 750 e 1000 (g/ton) apresentaram estabilidade de pH ao longo do período de avaliação. Para o perfil microbiológico e fermentativo dos silos a inclusão de protease trouxe efeitos positivos especialmente nos tratamentos 500 e 750 (g/ton). A digestibilidade apresentou comportamento quadrático para o amido. Para a fermentação ruminal, foi observado comportamento quadrático para propionato e butirato. Foi encontrado efeito apenas para a síntese microbiana (g/dia), com nitrogênio e proteína bruta apresentando comportamento quadrático. Assim, de acordo com as equações de regressão a inclusão ótima de protease é 427 g/ton. O capítulo III contempla o *Experimento 3* e 4. No *Experimento 3*, foram preparados 28 silos experimentais e distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos: CONTROLE (sem adição de enzimas); AMI (enzima amilolítica); PROT (enzima proteolítica); AMI + PROT (amilase + protease). O nível de protease utilizada no *Experimento 3* foi de 500 g/ton e a dose de amilase utilizada foi de 300ml/ton de matéria fresca. Também foi adicionado inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® a uma dose de 4 g/t de matéria fresca. As variáveis analisadas foram as mesmas do *Experimento 1*. Já no *experimento 4*, 8 ovinos mestiços foram alojados em gaiolas metabólicas em delineamento em quadrado latino 4x4 contemporâneos, sendo 2 quadrados em arranjo fatorial 2x2, duas enzimas e dois níveis de inclusão. Durante 56 dias, os animais consumiram silagem produzida de acordo com os tratamentos do *Experimento 3*. Assim como no *Experimento 2*, além das silagens experimentais, os animais recebiam feno e uma mistura proteica mineral. As variáveis

analisadas foram as mesmas do *Experimento 2*. Foi observado efeito no VN para a MS, FDN e o amido. Nas perdas fermentativas houve efeito para gases (MN) e (MS), efluente (MN) e (MS), perdas totais (MS) e recuperação (MS). Todas as variáveis relacionadas a estabilidade aeróbica tiveram efeito, com pH praticamente estável. A população de bactérias ácido lácticas e bactérias totais foi superior no tratamento AMI+PROT (interação). A população de mofos, fungos e leveduras, tiveram efeito para AMI e PROT. Sobre o perfil fermentativo houve resposta do pH em função da PROT e da interação, sendo maior na interação. Houve também diferença para a N-NH₃(mg/dl) em função da PROT e interação, sendo maior no tratamento PROT. Para o perfil de ácidos graxos (AG) foi possível observar diferença para lactato no tratamento PROT e na interação, com maior média de produção de lactato no tratamento PROT. Para valerato e AGtotais a resposta foi significativa para o tratamento PROT. Para a degradabilidade foi observado efeito para as frações A, A+B e DE 4%, 8% e 12%. Somente a digestibilidade da matéria seca e nutrientes apresentou significância, com a MS e a MO sendo significativa para PROT, o EE para AMI e o FDN e o amido para a interação. O pH teve efeito de AMI e o N-NH₃ de PROT. Para os ácidos orgânicos, foi possível verificar significância apenas para a PROT em isobutirato, valerato, isovalerato, AGCR e AGtotais. Foi observado efeito da interação sobre a síntese microbiana (g/dia). Foi estimado que a inclusão ótima de protease é 427 g/ton e que o uso combinado da protease com a amilase melhorou a estabilidade da silagem de grão de milho reidratado mantendo boas características nutricionais.

Palavras-chaves: amido, ensilagem, digestibilidade, síntese microbiana

ABSTRACT

BATISTA, Jamille Débora de Oliveira. Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados MS, setembro de 2022. **Inclusion of protease and amylase enzymes use in rehydrated corn wet grain silage in ruminant nutrition.** Supervisor: Dr. Jefferson Rodrigues Gandra.

The aim of this study was to evaluate the addition of protease and amylase in moist rehydrated corn grain silage. Four experiments were carried out, divided into two chapters. Chapter II covers *Experiments 1* and 2. In *Experiment 1*, 30 experimental silos were prepared and sealed for 45 days. The silos were randomly distributed into 5 treatments: 0 g of protease (control); 250 g of protease; 500 g of protease; 750g of protease and 1000g of protease per ton of moist rehydrated corn (CINBENZA DP100®, enzymatic extract of *Bacillus licheniformis*, protease activity 600 IU/g). In addition to the enzymes, the bacterial inoculant, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brazil) – *Lactobacillus plantarum* 4*10¹⁰ g/CFU + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6*10¹⁰ g/CFU – at a dose of 4 g/t fresh matter was added in all silos. Nutritional value, fermentative losses, aerobic stability, microbiological and fermentative profile and ruminal kinetics were evaluated in all silos. In *Experiment 2*, 5 crossbred sheep were housed in metabolic cages in a 5x5 latin square design. For 70 days, the animals consumed silage produced according to the treatments of *Experiment 1*. In addition to the experimental silages, the animals received hay and a mineral protein mixture. Intake and digestibility of dry matter and nutrients, rumen fermentation and nitrogen balance and microbial protein synthesis were evaluated. Comparing the enzymatic treatments to the control, it was possible to observe that the inclusion of enzyme increased the DM, CP and starch composition and reduced the NDF. The inclusion of protease decreased losses and increased recovery. The ambient temperature of the silos reduced in the control treatments, 250 and 500 (g/ton). Treatments 750 and 1000 (g/ton) showed pH stability throughout the evaluation period. For the microbiological and fermentative profile of the silos, the inclusion of protease brought effects especially in the treatments 500 and 750 (g/ton). Digestibility showed a quadratic behavior for starch. For ruminal fermentation, quadratic behavior was observed for propionate and butyrate. Effect was found only for microbial synthesis (g/day), with nitrogen and crude protein showing quadratic behavior. Thus, according to the regression equations the optimum protease inclusion is 427 g/ton. Chapter III covers *Experiments 3* and 4. In *Experiment 3*, 28 experimental silos were prepared and randomly distributed into 4 treatments: CONTROL (without addition of enzymes); AMI (amylolytic enzyme); PROT (proteolytic enzyme); AMI + PROT (amylase + protease). The protease level used in Experiment 3 was 500 g/ton and the amylase dose used was 300 ml/ton of fresh matter. A bacterial inoculant, Kerasil Grão Úmido®, was also added at a dose of 4 g/t of fresh matter. The analyzed variables were the same as in *Experiment 1*. In *experiment 4*, 8 crossbred sheep were housed in metabolic cages in a contemporary 4x4 Latin square design, with 2 squares in a 2x2 factorial arrangement. For 56 days, the animals consumed silage produced according to the treatments in Experiment 3. As in *Experiment 2*, in addition to the experimental silages, the animals received hay and a mineral protein mixture. An effect was observed on NV

for DM, NDF and starch. In the fermentative losses, there was an effect for gases (NM) and (DM), effluent (NM) and (DM), total losses (DM) and recovery (DM). All variables related to aerobic stability had an effect, with practically stable pH. The population of lactic acid bacteria was higher in the interaction treatment, as well as the total bacteria. The population of molds, fungi and yeasts influenced AMI and PROT. Regarding the fermentative profile, there was a pH response as a function of PROT and the interaction, being greater in the interaction. There was also a difference for N-NH₃(mg/dl) as a function of PROT and interaction, being greater in the PROT treatment. For the fatty acid (FA) profile, it was possible to observe a difference for lactate in the PROT treatment and in the interaction, with a higher average of lactate production in the PROT treatment. For valerate and total AG the response was significant for the PROT treatment. For degradability, an effect was observed for fractions A, A+B and DE 4%, 8% and 12%. Only the digestibility of dry matter and nutrients showed an effect. MS and the MO effect for PROT. EE AMI effect. And the NDF and the starch effect for the interaction. The pH had an AMI effect. The N-NH₃ effect of PROT. And for organic acids, it was possible to verify an effect only for the PROT treatment for isobutyrate, valerate, isovalerate, AGCR and total AG. An effect of the interaction on microbial synthesis (g/day) was observed. It was estimated that the optimal inclusion of protease is 427 g/ton and that the combined use of protease with amylase improved the stability of the rehydrated corn grain silage while maintaining good nutritional characteristics.

Keywords: digestibility, silage, starch, microbial synthesis

CAPÍTULO I

Considerações Iniciais

1. INTRODUÇÃO

A produção de milho em 2020 apresentou recorde comparado aos anos anteriores, chegando a 104,4 milhões de toneladas, superior 2,8 % ao ano de 2019. A produção de milho no Brasil representa aproximadamente 41,1% da produção agrícola nacional de grãos (PRESTES et al., 2019). O estado do Mato Grosso seguiu em primeiro lugar na produção de milho, com 33,7 milhões de toneladas, seguido do Paraná (15,8 milhões de toneladas) e de Goiás (11,8 milhões de toneladas) (IBGE, 2021). O milho é considerado uma das culturas mais importantes no cenário agrícola mundial, isto é decorrente da ampla aptidão de utilizações que esta gramínea apresenta, sendo imprescindível para a alimentação animal principalmente para a produção de silagem (CARVALHO et al., 2016), elaboração de rações e concentrados (ROSTAGNO, 2011).

O cultivo de milho (*Zea mays* L.) é o terceiro mais importante do mundo, depois do arroz e do trigo. Trata-se de uma monocotiledônea oriunda da América Central e extensivamente cultivado no Brasil. Os maiores produtores de milho no mundo são os Estados Unidos, a China e o Brasil, produzindo aproximadamente 563 das 717 milhões de toneladas/ano (PRESTES et al., 2019).

Com posição de destaque relacionado à importância econômica e social do agronegócio brasileiro (PEREIRA FILHO, 2015), o milho apresenta boas características nutricionais e uma variada forma de utilização, além de ser a cultura padrão para a ensilagem, pela tradição de cultivo, mas principalmente pela alta produtividade e bom valor nutritivo, constituindo-se como o principal componente energético dos concentrados (KLEIN et al., 2018), presente na dieta dos ruminantes (KLJAK; PINO; HEINRICHS, 2017).

Aproximadamente 4% da produção de milho ($\pm$ 1,6 milhão de toneladas), é direcionado para a alimentação humana e 10% destinado às indústrias alimentícias. A grande maioria, 70%, é utilizada para alimentação animal (PRESTES et al., 2019). De acordo com Barros & Alves (2015) este grão é o lastro de sustentação para o crescimento da produção animal no Brasil, pois a partir dessa matéria prima se faz a base da alimentação da cadeia produtiva de diversos setores agropecuários.

Mas, a maioria dos híbridos de milho cultivados no Brasil possui alta vitreosidade, que é definido como a porção do amido envolvida por uma densa camada protéica, que reduz a digestibilidade do amido (COSTA et al., 2014). E entre os principais fatores que

afetam a digestibilidade do amido de milho estão o método de armazenamento, os métodos de processamento de grãos, o tamanho das partículas e o tipo de endosperma (SAYLOR et al., 2020; ARCARI et al., 2016).

A adoção da ensilagem, como forma de conservação da forragem, é uma alternativa cada vez mais empregada como estratégia alimentar, que auxilia durante o período de escassez, maximiza o uso da terra e traz melhorias para a rentabilidade do sistema produtivo (KLEIN et al., 2018). Entretanto, a silagem de milho apresenta elevado custo de produção, somente sendo justificada quando produzida de forma tecnificada para resultar em forragem de alta qualidade (RABELO et al., 2017).

Por isso, a utilização de aditivos enzimáticos na dieta animal tem crescido no intuito de auxiliar no processo digestivo, melhorando a digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes e contribuindo com a melhora no desempenho produtivo. Dessa forma, conduziu-se este estudo com o objetivo de avaliar a adição de protease e amilase em silagem de milho reidratado e os efeitos sobre o consumo das enzimas e desempenho de pequenos ruminantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Características do milho

Com o aumento da produção animal, cresce também a demanda por alimentos que possam atender as exigências nutricionais dos animais e/ou substituir um alimento que demande maior investimento de capital para sua produção. Pesquisas por novos insumos, utilização de fontes alternativas e a seleção de matérias primas mais produtivas estão sendo desenvolvidas para suprir essa necessidade, e neste cenário, o milho (*Zea mays* L.) é um componente muito importante (DAWSON, 2012; PARREIRA FILHO et al., 2020). Ele constitui grande parte do alimento concentrado fornecido aos animais de produção, tais como as aves, bovinos e ovinos, sendo cerca de 70% da sua produção mundial destinada a este fim (PRESTES et al., 2019).

As várias formas de manusear este grão pode ser um fator primordial que contribui para maximizar o seu uso, seja na forma de grãos secos (especialmente pela indústria para alimentação humana), como ingrediente na elaboração de ração para alimentação animal ou como uma planta forrageira para fins de silagem (KLEIN et al., 2018). Neste último caso, o grão de milho apresenta requisitos importantes para conferir boas características

qualitativas a silagem, dentre as quais pode-se destacar: concentração de matéria seca em torno de 300-350 g/kg de MS, mínima concentração de carboidratos solúveis (3 g/kg de MS), para a adequada fermentação do material ensilado e baixo poder tampão, que permite a rápida queda do pH (MUCK et al., 2013). Nesse sentido, a Tabela 1, apresenta os níveis de porcentagem da constituição do grão de milho.

Tabela 1 - Percentual 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
Ponta	2	0,1	0,8	0,9	1,0	0,8	7,0

Fonte: Adaptado PAES, (2006).

O amido é o principal carboidrato (CHO) do milho, compõe de 80 a 85% do endosperma do grão e possui diferentes granulosidades e formatos (ARCARI et al., 2015). Ele pode ser classificado de acordo com sua estrutura física, química e com relação a sua suscetibilidade à hidrólise enzimática, e precisa ser acessado e digerido. É constituído por dois distintos polímeros de glicose: 15 a 25% de amilose e 75 a 85% de amilopectina (ECKERT et al., 2018), apesar de existir no mercado variedades de milho com até 65% de amilose (PRADYAWONG, 2018).

Mas, a escolha do tipo do grão a ser explorado não necessariamente vai priorizar a eficiência nutricional. Ela vai seguir uma separação geográfica e histórica conforme necessidades de adaptação ambiental, produtividade, tolerância climática, resistência a insetos (MLADENOVIC et al., 2019), podendo refletir sobre o desempenho animal por modificar as condições de degradabilidade conforme o tipo utilizado.

No Brasil, predominantemente são produzidas e comercializadas cultivares de tipo duro, com grãos vítreos, redondos e lisos, endosperma de alta densidade e rico em matriz proteica, diferente das variedades de regiões de clima temperado, onde prevalece o tipo dentado ou farináceo (DUARTE et al., 2007; ECKERT et al., 2018).

A diferença na dureza dos grãos está relacionada às zeínas, as principais proteínas do milho que ficam localizadas exteriormente aos grânulos de amido no endosperma, na forma de corpos protéicos (FORATO et al., 2013). Em variedades de endosperma farináceo os grânulos de amido são esferas dispersas no endosperma, enquanto em variedades de endosperma vítreo, os grânulos de amido são helicoidais e adensados a forte ligação entre os grânulos de amido e as prolaminas (zeínas), o que dificulta a quebra enzimática do amido a glicose (FORATO et al., 2013, McALLISTER et al., 2001). Dessa forma, quanto maior a vitreosidade do endosperma dos grãos, maior é a presença de prolamina envolvendo os grânulos de amido e menor a sua digestibilidade (PEREIRA et al., 2019; ANDRADE, 2013).

Nesse sentido, processar o alimento pode exercer grande influência sobre a digestibilidade do amido, melhorando o consumo e a eficiência de aproveitamento de seus nutrientes pelos animais (SAYLOR et al., 2020; PEREIRA et al., 2019; ANDRADE, 2013), principalmente no caso dos ruminantes (MARQUES, 2011). O processamento pode ser definido como qualquer processo físico que modifica a composição química ou a estrutura física dos alimentos (SOUZA et al., 2019).

Milho reidratado e ensilado

No caso do milho, o processamento traz efeitos positivos sobre a digestibilidade ruminal, pós-ruminal e total do amido (FERRARETTO; CRUMP; SHAVER, 2013), já que a maior exposição facilita os processos enzimáticos de degradação e digestão (SOUZA et al., 2019), uma vez que se tem uma maior área de contato, distúrbios na matriz protéica e à desorganização das ligações, que aumenta o acesso da microbiota ruminal aos substratos (THEURER et al., 1999). E, além das questões associadas a digestibilidade do amido, como o aumento na disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen (refletindo na produção de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais), o processamento também melhora os aspectos de conservação e de palatabilidade dos alimentos (SAYLOR et al., 2020).

Há diversos tipos de processamentos de grãos, a seco (quebrar, moer, tostar e peletizar) ou úmidos (flocular, expandir e cozer sob pressão) (SOUZA et al., 2019). A ensilagem é uma das formas de se utilizar o milho. Nesse tipo de processamento ocorre a degradação das prolaminas por ação das proteases microbianas no silo (HOFFMAN et al,

2011), que vai permitir a fermentação e conservação da massa ensilada (DEFFOR; BROWN; OWENS, 2006).

Utilizar o grão úmido (umidade de 30 a 35 %) para fazer silagem é uma opção para anteceder a colheita do milho, mas, devido ao curto tempo de colheita, sua utilização pode trazer restrições a fermentação, devido a um baixo nível de umidade assim como de açúcares fermentáveis (REZENDE et al., 2014). Dessa forma, a prática de reidratação dos grãos pode se tornar uma alternativa para contornar essa situação, já que é possível estabelecer o teor de umidade ideal e consequentemente garantir uma boa estocagem do material e uma fermentação adequada (PEREIRA et al., 2013). Outra vantagem é a produção da silagem em qualquer época do ano, visto que, o grão de milho pode ser adquirido de terceiros e reidratado na própria propriedade (FAUSTINO et al., 2020).

A reidratação do milho integra o grupo de processamentos úmidos (FRANZONI, 2012). Através dessa técnica ocorre o reumedecimento dos grãos secos até o teor de umidade adequado - aos grãos maduros, secos e moídos reconstitui-se umidade entre 30 e 40% da matéria mineral (MN), (ANDRADE FILHO et al., 2010), e assim é possível modificar os aspectos relacionados a digestibilidade do amido, já que durante o processo ocorre a proteólise da matriz protéica que envolve os grânulos de amido (FRANZONI, 2012).

É importante destacar que os grãos de milho, ao alcançarem a maturidade fisiológica com uma concentração de umidade em torno de 34% no milho dentado e 37% no milho duro, não sofrem mais alteração nos seus teores de amido (PHILIPPEAU; LANDRY; MICHALET-DOREAU, 2000). Isso demonstra que o milho colhido com alta umidade e o reidratado, provavelmente vão ter concentrações de amido semelhantes (ARCARI et al., 2016). Por isso, o processo de reconstituição do milho se torna uma alternativa interessante que agrega benefícios aos pecuaristas (PEREIRA et al., 2011), que vai atender desde demandas associadas aos sistemas tradicionais de armazenagem de milho (que por vezes refletem em significativas perdas qualitativas e quantitativas) até ganhos de características nutricionais do alimento, refletindo no desempenho dos animais (SILVA et al., 2014).

A produção da silagem de grãos reidratados se inicia com uma moagem bem fina. Então é adicionada a água, o inoculante para silagem, que vai ajudar no processo fermentativo, e é feita uma mistura vigorosa formando uma massa homogênea, que será

compactada e vedada no silo (FRANZONI, 2012). É importante ressaltar que a adequada incorporação da água ao grão de milho é uma prática fundamental para a qualidade da silagem de grão reidratado, falhas na hidratação do material podem favorecer o crescimento de fungos e resultar em perdas significativas no material ensilado (ANDRADE, 2013).

Adição de enzimas à nutrição de ruminantes

Enzimas são proteínas globulares responsáveis por catalisar biologicamente reações que quebram moléculas maiores no processo de degradação, aumentando a velocidade das respostas químicas no organismo, sem sofrerem alterações durante o processo (STIVARI et al., 2014). São substâncias orgânicas compostas por polímeros de aminoácidos, que vão decompor moléculas complexas em unidades menores, por exemplo, CHOs em açúcares, e que podem apresentar estrutura protéica primária, secundária, terciária e quaternária, sendo essenciais para o exercício da atividade catalítica (SOARES et al., 2010).

As enzimas em sua maioria são proteínas notáveis e especializadas, que atuam, em sequências organizadas, sob diversas reações bioquímicas. Elas catalisam as centenas de reações sucessivas pelas quais as moléculas nutrientes são degradadas, aumentando a velocidade das reações sem afetar seu equilíbrio. São altamente coordenadas e atuam de forma harmoniosa em diversas atividades, sendo de fundamental importância para a vida, pois sem a catálise, as respostas não aconteceriam em uma escala de tempo útil (STIVARI et al., 2014; NELSON & COX, 2005).

Atualmente, as dietas para alimentação animal são balanceadas levando em consideração muitos nutrientes diferentes (COLE et al., 2012). Por isso, estudos buscam entender melhor as reações para assim, maximizar o uso dos ingredientes (ELGHANDOUR et al., 2013). Entre os tipos de enzima mais utilizados estão as celulasas, hemicelulasas, amilases e proteases (STIVARI et al., 2014). As enzimas exógenas não são organismos vivos, mas produtos de organismos vivos (como bactérias e fungos) de alta especificidade, já que cada tipo de enzima atua sobre um composto ou substrato associado, que se encaixa na enzima específica, de modo que os centros ativos coincidem perfeitamente, sendo capazes de abrir caminhos para sua transformação (complexo enzima-substrato) (MAGNAGO et al., 2015).

No rúmen, para que apresente atividade enzimática a enzima não deve ser degradada pelos microrganismos. Além disso, ela deve suportar as condições de processamento da ração, e ter estabilidade ao longo do trato gastrointestinal do animal (STIVARI et al., 2014). Ainda segundo Stivari et al., (2014), além das enzimas agirem diretamente no alimento, elas podem potencializar a atividade de enzimas microbianas existentes no rúmen, agindo de modo sinérgico, aumentando a hidrólise direta. Dessa forma, são capazes de facilitar a adesão de microrganismos nas células vegetais, aumentando a população microbiana ruminal devido ao aumento da disponibilidade de nutrientes.

Outro aspecto que fomenta os estudos nesta área, é a busca de um melhor entendimento da ação sinérgica de enzimas endógenas e exógenas sobre a digestibilidade, que pode refletir sobre o valor nutricional da dieta (YOUNG et al., 2012). A inclusão de enzimas leva a um melhor aproveitamento dos alimentos pelos animais com consequente redução do custo de produção associado à alimentação (BEAUCHEMIN et al., 2003), principalmente de silagens e cereais, ingredientes mais utilizados na alimentação de ruminantes.

Para Aspevik et al. (2017), na nutrição dos animais a suplementação das dietas com enzimas exógenas vai melhorar o valor nutritivo das diferentes matérias-primas, o valor nutricional do produto e atender às exigências do consumidor por um produto seguro, saudável e favorável ao ambiente. Segundo Silva et al., (2007), as principais metas da suplementação enzimática para os animais são:

- Remover ou destruir os fatores antinutricionais dos grãos;
- Aumentar a digestibilidade total do alimento;
- Potencializar a ação das enzimas endógenas;
- Diminuir a poluição ambiental causada por nutrientes excretados nas fezes.

As enzimas não têm função nutricional direta, mas, auxiliam o processo digestivo, aumentando a velocidade das reações (PESSOA, 2010), refletindo sobre o desempenho e na rentabilidade. Elas podem ser classificadas conforme a sua finalidade, como indica a Tabela 2, que segue abaixo.

Tabela 2 - Classificação das enzimas.

FINALIDADE	TIPOS
Complementar quantitativamente as próprias enzimas digestórias endógenas	Proteases, amilase e fitases
Suprir a necessidade quando o organismo não é capaz de produzir, ou produz em baixa quantidade	β -glucanas, pentosanas e α -galactosidades

Fonte: Adaptado de Campestrini et al., (2005).

A aplicação de aditivos enzimáticos na alimentação animal traz efeitos benéficos sobre a digestibilidade dos nutrientes e tem a finalidade de ajudar no processo digestivo, aumentando, por exemplo, a disponibilidade dos nutrientes presentes na silagem (DE PAULA; CHEN; MAIA, 2009). Mas, ainda há grandes incógnitas a serem exploradas quanto ao uso de enzimas exógenas na nutrição animal. O que já se sabe, é que elas podem promover melhoras quanto aos parâmetros de cinética ruminal (ELGHANDOUR et al., 2013), digestibilidade de nutrientes (YANG et al., 2011; TANG et al., 2008) e que podem permitir a manipulação de produtos da fermentação (TRICARICO et al., 2005; 2008), sem alterar a composição da dieta a ser fornecida.

Porém, os mecanismos que levam a essas respostas ainda precisam ser melhor compreendidos (YANG et al., 2011; RANILLA et al., 2008). Por exemplo, as diferenças na atividade enzimática, a taxa e a composição de aplicação, o modo e o tempo de contato enzimático, a especificidade enzima-alimento (ADESOGAN et al., 2014) assim como o próprio material ensilado (REIS et al., 2015), são fatores que têm relação com o potencial de ação das enzimas exógenas e que devem ser levados em consideração.

Para a ação da enzima, o contato com o substrato é essencial. Estudos com a adição das enzimas diretamente no alimento verificaram uma maior estabilidade enzimática graças à formação do complexo enzima-substrato, dificultando a ação de proteases microbianas. A formação desse complexo também aumenta o seu tempo de permanência no ambiente ruminal por não estar dissolvida no fluído ruminal. Na falta do complexo enzima-substrato estável, as enzimas se solubilizam no líquido ruminal e fluem rapidamente para o intestino (BEAUCHEMIN et al., 2003).

O efeito da adição de enzimas e/ou complexos enzimáticos sobre as variáveis de produção e/ou metabolismo pode ser decorrente de variados fatores, especialmente do tipo de dieta e da forma de suplementação da enzima (BARBOSA et al., 2014). No rúmen,

as enzimas podem agir diretamente nos alimentos ou estimular indiretamente a digestão, potencializando as atividades das enzimas microbianas (McALLISTER et al., 2001).

Para que seja possível entender os efeitos do uso de enzimas exógenas na alimentação animal e auxiliar os profissionais a identificar preparações enzimáticas ideais e dosagens eficientes antes de criar produtos comerciais lucrativos para a indústria (EUN & BEAUCHEMIN, 2008), seguem os estudos nessa área.

Amilases

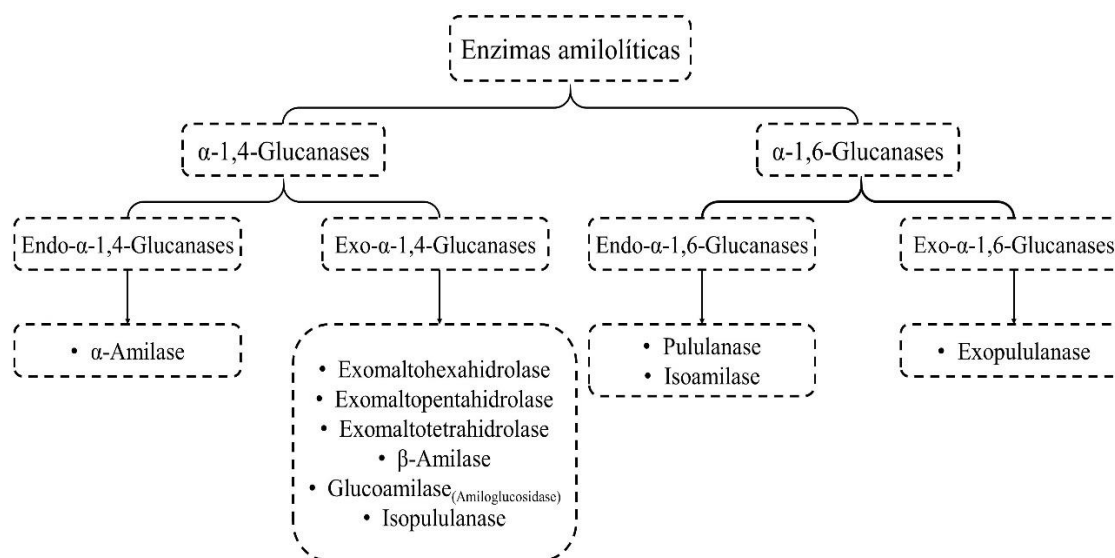
Segundo Gupta et al. (2003) as amilases são enzimas da família das hidrolases capazes de degradar o amido e até sacarídeos de baixo peso molecular. São amplamente distribuídas na natureza, e podem ser produzidas por bactérias, fungos, plantas e animais. Existem várias proporções de amilase microbianas disponíveis no mercado, tendo aplicações praticamente completas na hidrólise do amido, em indústria de processamento de amido. Estas enzimas se destacam na família das hidrolases, pelo fato de serem amplamente aplicadas no setor industrial, devido à grande aplicação do amido e de seus derivados em processos industriais. Sua aplicação depende de características como: modo de ação, especificidade com o substrato, produtos gerados, temperatura e pH ótimo.

A amilase é originada por um polímero linear de duas unidades de glicose unidas entre si por ligações α -1,4. A amilopectina é a fração ramificada, formada por cadeia de glicose com ligações α -1,4 e pontos de ramificações formadas por ligações α -1,6. O tamanho dos grânulos de amido e a proporção entre amilase e amilopectina contidas nos grânulos podem variar conforme a espécie vegetal e a variedade botânica (TESTER et al., 2004).

As amilases têm a capacidade de quebrar as ligações glicosídicas α (1,4) e α (1,6) das moléculas de amilose e amilopectina, liberando diversos fragmentos. Contudo, nem todas as bactérias possuem todas as enzimas necessárias para promover todo o processo de degradação do amido até glicose, existindo diversas endo e exoamilases do tipo α (1,4) e α (1,6). Diante disto, a sintonia entre as diversas espécies de bactérias é fundamental para a fermentação do amido (HUNTINGTON, 1997). A amilase tem atividade endohidrolítica e de forma aleatória atua sobre ligações glicosídicas α -1,4, produzindo uma mistura de glicose, maltose e dextrinas, que pode ser encontrada nos animais, plantas, fungos e bactérias (VIEIRA JÚNIOR, 2006).

A amilose é um polissacarídeo de cadeia linear de moléculas de glicose conectadas por ligações glicosídicas α -1,4, que se alinha com numerosas ligações de hidrogênio, dificultando a ação das enzimas, resultando em hidrólise reduzida se comparada a amilopectina, que é um polímero solúvel em água e altamente ramificado, onde as moléculas de glicose estão conectadas com ligações glicosídicas α -1,4 e a ramificação ocorre nas ligações glicosídicas α -1,6, a cada 24 a 630 unidades de glicose (PRADYAWONG, 2018). Elevadas temperaturas durante a moagem de amidos no processo convencional de moagem a seco auxiliam a quebra das ligações de hidrogênio e tornam a amilose disponível para a ação da amilase (PRADYAWONG, 2018). Pesquisas indicam que uma alta proporção de amilose para amilopectina está negativamente correlacionada com digestão de amido (VANIER et al., 2016; ZHAO, 2018).

As amilases, são enzimas que quebram o amido ou o glicogênio em oligossacarídeos de tamanhos diferentes. Os membros da família da amilase são classificados de acordo com o tipo de hidrólise das moléculas de amido. α -amilase (EC 3.2.1.1), β -amilase (E.C 3.2.1.2), e glucoamilase (E.C 3.2.1.3), têm sido amplamente utilizados em detergentes, alimentos, papel e industrial têxtil (GUPTA et al., 2003; GANGADHARAN, 2008;). A α -amilase hidrolisa as ligações internas α -1,4 em amido de forma aleatória conduzindo a formação de maltodextrinas solúveis, maltose e glicose (GANGADHARAN et al., 2008). As β -amilase hidrolisam as ligações α -1,4-glicano em cadeias de amilosacarídeos, através das extremidades não redutoras e gera maltose. As glucoamilase (1,4-alfa-D-glican-glicanohidrolase) hidrolisam ligações sucessivas na extremidade não redutora das moléculas de amido, liberando glicose (CANTAREL, 2009). A Figura 1 demonstra um esquema de identificação e classificação das enzimas amilolíticas:



Adaptado de Nigam; Singh, (1995)

Figura 1 - Classificação das enzimas amilolíticas.

As amilases classificam-se quanto ao seu mecanismo de ação ou quanto ao tipo de ligação que hidrolisam. Quanto ao mecanismo de ação podem ser classificadas como endoamilases (clivam ligações glicosídicas a acaso no interior do polímero), ou exoamilase (hidrolisam, sucessivamente, ligações glicosídicas a partir da extremidade não-redutora da molécula) (GUPTA et al., 2003). Quanto às ligações hidrolisadas, podem ser agrupadas em: α -amilases, β -amilases, glucoamilase, pululanases, γ -D-glucosidase, exoglucanase, isoamilase, ciclodextrinases glicotransferase e isomaltase.

Gupta et al. (2003) citam que as amilases hidrolisam moléculas de amido, glicogênio e polissacarídeos liberando diversos produtos, incluindo dextrinas e pequenos polímeros compostos de unidades de glicose e que têm sido amplamente utilizadas em diversos setores, desde a produção de xaropes de glicose ou frutose, passando pela panificação (como fator ante envelhecedor), a inclusão como componente de detergentes para lavanderia e louças até as indústrias de nutrição animal, e compreendem cerca de 30% da produção mundial das enzimas.

As pesquisas com enzimas amilolíticas, obtidas pelo cultivo de bactérias, começaram no final da década de 60, com a intenção de melhorar a alimentação animal, refletindo na eficiência de conversão da dieta oferecida aos animais, na redução dos custos de produção e no aumento no retorno econômico (BEAUCHEMIN et al., 2003). Segundo estudos, no trato digestório, a α -amilase é responsável por hidrolisar

polissacarídeos a dissacarídeos e oligossacarídeos. Quando a hidrólise não ocorre com eficiência devido a deficiência das enzimas pancreáticas, provoca diminuição da digestibilidade dos componentes da dieta e reduz o crescimento do animal (NITSAN et al., 1991).

Em diversos estudos *in vitro* e *in vivo* evidências sugerem que a adição de amilase exógena pode incrementar o desempenho animal (KLINGERMAN et al., 2009). Através da ação hidrolítica, a γ -amilase, hipoteticamente, aumenta a disponibilidade de produtos resultantes da hidrólise do amido no rúmen, como os oligossacarídeos, alteram o processo de fermentação ruminal pelo fornecimento de substratos mais facilmente hidrolisáveis pelos microrganismos ruminais e aumenta a degradação do amido no rúmen (TRICARICO et al., 2008).

Segundo Nozière et al. (2014) a adição de amilase na dieta de vacas leiteiras aumentou em 65 g/kg a digestibilidade do amido, e esse aumento na digestibilidade não está associado com aumento da comunidade microbiana ou mudanças na atividade amilolítica dos *Streptococcus bovis*. De maneira distinta, Gencoglu et al. (2010) e Klingerman et al. (2009) observaram aumento na digestibilidade da fibra em detergente neutro (FDN) e atribuíram essa melhora como o principal efeito da adição de amilase exógena para vacas leiteiras. Segundo Gallo et al. (2016) o efeito da amilase nos padrões de fermentação ruminal com diminuição do tempo de colonização, produz aumento da produção de gás e da taxa de degradação.

Acredita-se que as amilases aumentam a quantidade de oligossacarídeos disponíveis no rúmen, facilitando a hidrólise do mesmo pelos microrganismos que ali se encontram o que aumenta a degradação do amido, alterando o processo de fermentação ruminal. Além disso, o aumento da degradação e oferta de nutrientes promovidos pela presença das amilases, acarreta o aumento de açúcares, fazendo com que ocorra um crescimento do número e desenvolvimento dos microrganismos, que tem reflexos sobre o poder de digestão do amido no ambiente ruminal (MORAES, 2004).

Na dieta de ruminantes, geralmente, o milho representa a principal fonte de energia, constituído em sua maioria por amido, que é composto especialmente por dois polissacarídeos, amilose e amilopectina (BEDNAR et al., 2001). As proporções entre estes compostos variam entre as espécies e variedades de grãos, e à medida que o grão de milho vai atingindo a maturidade fisiológica, o conteúdo de amilose no grão de milho

tende a aumentar (GOUVÊA, 2012). Em endosperma farináceo o milho apresenta alta proporção de amilopectina e as características do endosperma vítreo do milho *flint* ou duro estão associadas com o conteúdo de amilose (VAN SOEST, 1994). A digestibilidade do amido é inversamente proporcional ao teor de amilose, quanto maior for o teor de amilopectina maior será digestibilidade (JOBIM et al., 2003).

O amido é fermentado naturalmente pela amilase produzida pelos microrganismos presentes no rúmen, mas não todo, podendo restar até 30% desse nutriente, que pode sofrer digestão na primeira porção do intestino ou ser fermentado na porção final (FOLEY et al., 2006). Segundo Hristov et al. (2008) algumas enzimas podem ser mais resistentes que outras, sendo capazes de transpor o ambiente ruminal e permanecerem ativas no abomaso e intestino, agindo de forma sinérgica ao organismo e auxiliando a digestão de materiais que escapam da fermentação ruminal.

A suplementação enzimática com enzimas amilolíticas na dieta de ruminantes pode aumentar a digestibilidade do amido e de outros polissacarídeos, maximizando o aproveitamento dos mesmos, aumentando a produção animal (DILorenzo et al., 2011), melhorando especialmente as características nutricionais de variedades mais vítreas.

Protease

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas entre os aminoácidos, sendo classificadas segundo sua atividade máxima em pH: proteases ácidas, neutras ou alcalinas. São amplamente utilizados em processos biotecnológicos nas indústrias têxteis, papel, couro, detergentes, bebidas destiladas, cervejas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido (produção de xaropes), ração animal, indústria química e farmacêutica. A partir da hidrólise, tem-se a geração de peptídeos e aminoácidos livres, que permitem a absorção pelas células do trato gastrointestinal (QUEIROZ e SOUSA 2020). O processo de quebra das ligações peptídicas é chamado de clivagem proteolítica, e é um mecanismo comum de ativação ou inativação de enzimas envolvidas principalmente na digestão e na coagulação sanguínea.

Como uma molécula de água é utilizada no processo de clivagem, as proteases são classificadas como hidrolases (SANTOS, 2007). Estas enzimas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais e micro-organismos, e são fisiologicamente necessárias à sobrevivência de todos os seres vivos (RAO et al., 1998) e por sua extensa

aplicação biotecnológica, constitui em um dos mais importantes grupos de enzimas produzidas comercialmente (BARRETT, 1994).

Proteínas pouco disponíveis, ou com fatores antinutricionais, ou ainda, proteínas alergênicas podem ter seu uso potencializado através da utilização de proteases (CLASSEN, 1996). Proteínas e aminoácidos que escapam da ação enzimática nas etapas iniciais da digestão, podem produzir substâncias e aminas tóxicas pelo processo de fermentação no intestino grosso, resultando em baixo aproveitamento de proteínas com consequente incremento na excreção de nitrogênio, que é um elemento poluidor, além de representar prejuízo econômico ao produtor, por se tratar de um nutriente caro. O uso de proteases pode melhorar a digestão da proteína e reduzir a excreção de nitrogênio (FIREMAN & FIREMAN, 1998).

A utilização das proteases como agentes de modificação das propriedades funcionais de proteínas tem sido amplamente difundida. Quando se fala do uso de enzimas em silagens, é importante ressaltar que durante o tempo de ensilagem a matriz da prolamina dos grãos presentes no silo pode ser degradada, principalmente pela ação de enzimas proteolíticas, e isso favorece a acessibilidade dos microrganismos aos grânulos de amido (JUNGES et al., 2017). As proteases hidrolisam as cadeias peptídicas das proteínas que envolvem os grânulos de amido, deixando-o mais digestível (ROSEIRA, 2019). Esse grupo de enzimas ainda tem ação sobre as frações antinutricionais, como nas lecitinas e inibidores de tripsinas, o que eleva a digestibilidade de aminoácidos e do metabolismo energético (MOHAMED et al., 2013).

Os estudos com a protease demonstram que ela é utilizada com maior frequência em dietas à base de cereais, já que ela tem ação mais específica sobre a matriz protéica da parede celular dos grãos, e com isso facilita a ação da microbiota ruminal nesse tipo de material (BAE et al., 1997). Dessa forma, a suplementação das enzimas proteolíticas exógenas, no exemplo da protease, pode contribuir com a redução dos custos da dieta, possibilitando a utilização de alimentos com proteínas pouco digestíveis (GOMES et al., 2016).

Pesquisas têm demonstrado que as proteases endógenas sintetizadas e liberadas no trato gastrointestinal podem ser suficientes para, aumentar a utilização da proteína da ração (FREITAS et al., 2011). E tal benefício permite reduzir o gasto energético, pois o

animal gasta menos energia para realizar os processos de digestão, o que resulta em mais energia disponível para os processos produtivos (LIMA et al., 2007).

Conforme Chu (2007) são comuns na natureza, mas os microrganismos servem como fonte principal destas enzimas por causa do seu rápido crescimento, o espaço limitado requerido para o cultivo, e a facilidade com que eles podem ser manipulados geneticamente, para produzir novas enzimas com propriedades alteradas que são desejáveis para as suas várias aplicações.

Digestibilidade do amido de silagem de grão úmido mais adição de enzimas

A utilização de aditivos na ensilagem tem como objetivo melhorar a qualidade da fermentação durante o período de armazenamento e manter a estabilidade aeróbia durante a utilização da silagem, e assim, reduzir perdas de nutrientes, aumentar o consumo de MS e melhorar o desempenho dos animais (LUGÃO et al., 2011). Além disso, é esperado que esses aditivos inibam diretamente a proliferação de clostrídios e outros microrganismos prejudiciais, mitiguem os níveis de micotoxinas, e aumentem a estabilidade aeróbica, melhorando assim a digestibilidade da parede celular, e aumentando a eficiência de utilização do nitrogênio da silagem pelos ruminantes, e aumentando a disponibilidade de amido para os animais (MUCK et al., 2018).

Desse modo, é de extrema importância o conhecimento da utilização de aditivos, em relação ao quanto eles podem melhorar o padrão de fermentação, consumo, digestibilidade e a produção animal. A produção de ácido lático é desejável e tem a finalidade de promover a fermentação láctica, principalmente pelos gêneros: *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Lactococcus*. Esse ácido ajuda a reduzir o pH mais rapidamente, sendo essa uma característica muito interessante pois, quanto mais rápido o pH diminui, melhor a qualidade final da silagem, visto que o pH =4,0 ou inferior ajuda no controle de microrganismos indesejáveis (PEREIRA, 2017).

Rezende et al. (2014) descreveu que o conteúdo de PB acima de 99 g.kg⁻¹ para silagem de milho reidratada (umidade média, 350 g.kg⁻¹) pode sofrer intensa desaminação e proteólise. Isso pode ocorrer como resultado da maior degradação da matriz protéica do amido e sugere uma maior digestibilidade do amido do milho reidratado. Muck et al. (2018) relatou que uma grande variedade de aditivos enzimáticos tem sido adicionada às forragens na ensilagem em um esforço para melhorar a

fermentação e o valor nutritivo da silagem. Desses, a grande maioria aplicou uma mistura de celulasas e hemicelulasas para aumentar a liberação de carboidratos da parede celular da planta, tornando-os disponíveis para as bactérias ácido-láticas fermentarem em ácido láctico. Aditivos enzimáticos são quase invariavelmente aplicados em combinação com inoculantes bacterianos, dificultando a diferenciação entre respostas de ensilagem mediadas por bactérias e enzimas. Em estudos que permitem a diferenciação, a adição de enzimas fibrolíticas a inoculantes bacterianos tem tido um efeito positivo na qualidade da silagem, aumentando o teor de FDN solúvel e melhorando a eficiência alimentar em bovinos confinados.

Embora aditivos enzimáticos destinados a melhorar a digestão da parede celular da planta na silagem tenham sido usados há décadas, apenas recentemente houve interesse em usar proteases para hidrolisar a matriz proteica dentro do endosperma do milho para melhorar a disponibilidade de amido digestível na silagem de milho. A proteólise ocorre naturalmente durante a ensilagem, mas requer até 10 meses para que a matriz proteica seja hidrolisada de forma a otimizar a disponibilidade de amido na silagem de milho. A matriz proteica é particularmente recalcitrante na silagem de milho colhida tardiamente, mas se o amido puder ser disponibilizado através da ruptura da matriz protéica por proteases, o rendimento total de MS colhido pode ser aumentado (MUCK et al., 2018).

A seleção de proteases que exibem estabilidade e atividade superiores sob baixo pH e condições adversas encontradas na silagem pode aumentar ainda mais a disponibilidade de amido em silagens de milho e sorgo, onde a matriz protéica vítrea pode limitar a disponibilidade de amido. Deste modo, mais pesquisas são necessárias para definir a concentração ideal de proteases que atingem essa resposta sem efeitos negativos indevidos na qualidade da proteína da silagem e para determinar se o valor econômico obtido pela disponibilidade de amido melhorada compensa o custo da aplicação da enzima (MUCK et al., 2018).

3. HIPÓTESE

A combinação da adição de enzimas proteolíticas e amilolíticas pode melhorar a composição químico-bromatológica da silagem de grão úmido de milho reidratado e reduzir as perdas fermentativas e a contagem de fungos e leveduras e aumentar a estabilidade aeróbia e a contagem de BAL, assim como modificar positivamente o perfil fermentativo da silagem e com acréscimos ao valor nutricional.

4. OBJETIVO

Geral

No contexto apresentado, objetivou-se avaliar a adição de enzimas exógenas protease e amilase em silagem de grão úmido de milho reidratado.

Específicos

Avaliar os efeitos da adição de enzimas sobre:

O valor nutricional da silagem de grão de milho reidratado,

O perfil fermentativo (produção de ácidos orgânicos e amônia) da silagem de grão de milho reidratado,

A estabilidade aeróbica e as perdas fermentativas após a abertura dos silos;

A composição químico-bromatológica da silagem de milho reidratado;

O comportamento microbiológico na silagem de milho reidratado;

O comportamento enzimático na silagem de milho reidratado;

As perdas fermentativas e a estabilidade aeróbia após a abertura dos silos;

O desempenho de ovinos alimentados com as silagens experimentais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESOGAN, A. T., MA, A. T. Z. X., ROMERO, J. J. and ARRIOLA, K. G. 2014. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes (Invited review). **Journal of Animal Science**, vol. 92, n. 4, pag. :1317-1330. doi: 10.2527/jas.2013-7273.

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

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

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

ARCARI, M. A.; MARTINS, C. M. M. R.; TOMAZI, T.; GONC, J. L.; SANTOS, M. V. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield

and nutrient digestibility. **Animal Feed Science and Technology** v. 221, p. 167–173, 2016.

ASPEVIK, T.; OTERHALS, Å.; RONNING, S. B.; ALTINTZOGLOU, T.; WUBSHET, S. G.; GILDBERG, A.; & LINDBERG, D. Valorização de Proteínas de Co-e Subprodutos da Indústria de Peixe e Carne. **Tópicos em Química Atual**, v. 375, p. 53, 2017.

BAE, H.D.; MCLALLISTER, T.A.; KIKKI, E.G.; LEGGETT, F.L.; YANKE, L.J.; JAKOBER, K.D.; HA, J.K.; SHIN, H.T. AND CHENG, K.-J. Effect of silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. **Animal Feed Science and Technology** 65, 165–181, 1997

BARBOSA, N. A. A.; BONATO, M. A.; SAKOMURA, N. K.; DOURADO, L. R. B.; FERNANDES, J. B. K.; & KAWAUCHI, I. M. Digestibilidade ileal de frangos de corte alimentados com dietas suplementadas com enzimas exógenas. **Comunicata Scientiae**, v. 5, n. 4, p. 361 - 369, 2014.

BARRETT, A. J. Classification of peptidases. In: BARRETT, A. J. (ed). **Methods in Enzymology**. New York: Academic Press Incorporated California, v. 244, p. 1-59, 1994.

BARROS, G.S. de C.; ALVES, L.R.A. Maior eficiência econômica e técnica depende do suporte das políticas públicas. **Visão agrícola**. USP ESALQ. V 13. Piracicaba - SP, dezembro de 2015.

BEAUCHEMIN K.A.; COLOMBATTO D.; MORGAVI D.P.; YANG W.Z. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve animal feed utilization by ruminants. **Journal of Animal Science**. v.81(E.Suppl.2), p. E37-E47, 2003.

BEDNAR, G. E.; PATIL, A. R.; MURRAY, S. M.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; FAHEY, G. C. Starch and fiber fractions in selected food and feed ingredients affect their small intestinal digestibility and fermentability and their large bowel fermentability in vitro in a canine model. **The Journal of Nutrition**, vol. 131, n. 2, pag. 276–286, February 2001.

CAMPESTRINI, E.; SILVA, V. T. M.; APPELT, M. D. Utilização de enzimas na alimentação animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 2, n. 6, p. 259–272, 2005.

CANTAREL, B. L.; COUTINHO, P. M.; RANCUREL, C.; BERNARD, T.; LOMBARD, V.; HENRISSAT, B. The carbohydrate-active ENZYMES database (CAZy): an expert resource for glycogenomics. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D233-D238, 2009.

CARVALHO, I. R.; NARDINO, M.; PELEGRIN, A. J.; FERRARI, M.; DEMARI, G. H.; SZARESKEI, V. J.; BARBOSA, M. H.; SOUZA, V. Q. Path analysis and Annicchiarico method applied in relation to protein in corn grains. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.10, n.1, p.300-306, 2016.

CHU, W. H. Optimization of Extracellular Alkaline Protease Production from *Bacillus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Republic of Korea, v.38, p. 241–245, 2007.

CLASSEN, H. L. Cereal grain starch and exogenous enzymes in poultry diets. **Animal Feed Science And Technology**, Saskatoon, v. 62, n. 1, p.21-27, 1996.

COLE, N.A.; TODD, R.W.; HALES, K.E.; PARKER, D.B.; BROWN, M.S.; MACDONALD, J.C. Nutritional management of feedlot cattle to optimize performance and minimize environmental impact. In: International SYMPOSIUM OF BEEF CATTLE PRODUCTION, 4, 2012, Viçosa, MG. **Proceedings...** Viçosa, MG, 2012. p.1–50.

DE PAULA, E.F.E.; CHEN, R.F.F.; MAIA, F.P. Enzimas exógenas na nutrição de animais monogástricos. **PUBVET**, Londrina, V. 3, N. 14, 2009.

DIORENZO, N.; SMITH, D. R.; QUINN, M. J.; MAY, M. L.; PONCE, C. H.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A.; GALYEAN, M. L. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. **Livestock Science**, v. 137, n. 1, p. 178-184, 2011.

DUARTE, A. P.; HENRIQUES, D. R.; CÔRREA, P. C.; e PATERNIANI, M. E. A. G. Z. Produtividade, aparência, densidade e suscetibilidade à quebra dos grãos em híbridos de milho, na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, p. 174-185, 2007.

ECKERT, C. T.; FRIGO, E. P.; ALBERECHT, L. P.; ALBRECHT, A. J. P.; CHRIST, D.; SANTOS, W. G.; ... EGEWARTH, V. A. Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. 3, p. 3907–3912, 2018.

ELGHANDOUR, M.M.Y.; SALEMA, A.Z.M.; GONZALEZ-RONQUILLOA, M.; BÓRQUEZA, J.L.; GADOB, H.M.; ODONGOC, N.E.; PENUELASA, C.G. Effects of exogenous enzymes on in vitro gas production kinetics and ruminal fermentation of four fibrous feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.179, p.46-53, 2013.

EUN, J.S., BEAUCHEMIN, K.A. Assessment of the potential of feed enzyme additives to enhance utilization of corn silage fibre by ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, vol. 88, n. 1, pag. 97–106, 2008.

FAUSTINO, T. F.; SILVA, N. C. D.; LEITE, R. F.; FLORENTINO, L. A.; REZENDE, A. V. Utilização de grão de milho reidratado e casca de café na alimentação animal. **Revista Científica Rural**, v. 22, n. 1, p. 259 – 275, 2020.

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.

FIREMAN, F. A. T.; FIREMAN, A. K. B. A. T. Enzimas na alimentação de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p.173-178, 1998.

FOLEY, A. E. et al. Effect of barley and its amylopectin content on ruminal fermentation and nitrogen utilization in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 11, p. 4321-35, 2006.

FORATO, L. A.; BRITTO, D. D.; SCRAMIN, J. A.; COLNAGO, L. A.; ASSIS, O. B.. Propriedades mecânicas e molhabilidade de filmes de zeínas extraídas de glúten de milho. **Polímeros**, v. 23, p. 42-48, 2013.

FRANZONI, A. P. S. **Efeito do processamento do milho no desenvolvimento do rúmen, desempenho de bezerros e digestibilidade in vitro do grão**. 2012. 138p. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, 2012.

FREITAS, D. M.; VIEIRA, S. L.; ANGEL, C. R.; FAVERO, A.; MAIORKA, A. Performance and nutrient utilization of broilers fed diets supplemented with a novel monocomponent protease. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 3, p. 322–334, 2011.

GALLO, A.; GIUBERTI, G.; DUVAL, S.; MOSCHINI, M.; MASOERO, F. Short communication: The effect of an exogenous enzyme with amylolytic activity on gas production and in vitro rumen starch degradability of small and large particles of corn or barley meals. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 5, p. 3602–3606, 2016.

GENCOGLU, H.; SHAVER, R. D.; STEINBERG, W.; ENSINK, J.; FERRARETTO, L.F.; BERTICS, S.J.; LOPES, J.C.; AKINS, M.S. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 723–732, 2010.

GOMES, V. D. S.; SILVA, J. H. V.; CAVALCANTI, C. R.; FONSECA, S. B.; JORDÃO FILHO, J.; SILVA NETO, M. R.; & SILVA, F. B. Utilização de enzimas exógenas na nutrição de peixes-revisão de literatura. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 19, n. 4, p. 259-264, 2016.

GOUVÊA, V. N. Processamento de grãos de milho flint e sua substituição por polpa cítrica em dietas para tourinhos Nelore terminados em confinamento. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.

GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V.K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1599–1616, 2003.

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.

HRISTOV, A. N.; BASEL, C. E.; MELGAR, A.; FOLEY, E.; ROPP, K; HUNT. W.; TRICARICO, J. M. Effect of exogenous polysaccharide-degrading enzymes preparations on ruminal fermentation and digestibility of nutrients in dairy cows. **Animal Feed**

Science and Technology, v. 145, p. 182 -193, 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.051>

HUNTINGTON, G. B. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. **Journal Animal Science**. v. 75, p. 852–867, 1997.

IBGE, 2021. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/31672-pam-2020-valor-da-producao-agricola-nacional-cresce-30-4-e-chega-a-r-470-5-bilhoes-recorde-da-serie>. Acesso em: 15 de out de 2021.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; SPOTO, M. H. F.; SANTOS, P. S.; ADESOGAN, A. T.; NUSSIO, L. G.; DANIEL, J. L. P.. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 11, p. 9048–9051, 2017.

KLEIN, J. L.; VIANA, A. F. P.; MARTINI, P. M.; ADAMS, S. M.; GUZATTO, C.; BONA, R. D. A.; ... & BRONDANI, I. L. Desempenho produtivo de híbridos de milho para a produção de silagem da planta inteira. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 17, n.1, p. 101-110, 2018.

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

KLJAK, K.; PINO, F.; HEINRICHS, A.J. Effect of forage to concentrate ratio with sorghum silage as a source of forage on rumen fermentation, N balance, and purine derivative excretion in limit-fed dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 1, p. 1–11, 2017.

LIMA, M.R.; SILVA J.H.V.; ARAÚJO, J.A.; LIMA, C.B.; OLIVEIRA E.R.A. Enzimas exógenas na alimentação de aves. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.1, p.99- 110, 2007.

LUGÃO, S.M.B. Silagem de Grão Úmido de Milho. In: KIYOTA, N.; VIEIRA, J.A.N.; YAGI, R.; LUGÃO, S.M.B. Silagem de Milho na Atividade Leiteira do Sudoeste do Paraná: do manejo de solo e de seus nutrientes a ensilagem de planta inteira e grãos úmidos. Lapar, p.99-112, 2011.

MAGNAGO, J. G. P.; HAESE, D., KILL, J. L.; SOBREIRO, R. P.; DEL PUPPO, D.; SANT'ANNA, D.; & PIMENTEL, R.B. Níveis de fitase sobre o desempenho, parâmetros ósseos e bioquímicos de suínos alimentados com ração de origem vegetal sem inclusão de fosfato bicalcico. **Ciência Rural**, 45, 1286-1291, 2015.

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

McALLISTER, T. A.; HRISTOV, A.N.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxon: Cab International, cap 11, p.273-298, 2001.

McALLISTER, T.A.; A.N. HRISTOV, K.A.; BEAUCHEMIN, L.M.; RODE, K.J.; CHENG. Enzymes in ruminant diets. **Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC)**, Department of Animal Science, University of British Columbia, Lethbridge, Canada, 2003.

MLADENović, D. S.; NIKOLIĆ, A.; KRAVIĆ, N.; SRDIĆ, J.; KOVAČEVIĆ, D.; ANĐELKOVIĆ, V.; FILIPOVIĆ, M. Divergence among maize genotypes with different kernel types according to SSR marker analysis. **Genetika**, v. 51, n. 1, 237-249, 2019.

MOHAMED, D. E. A.; B. E BORHAMI, K.A.; EL-SHAZY AND S.M.A.; SALLAM. Effect of dietary supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactating dairy cows. *Journal Agriculture Science*, v. 5, p. 146-155, 2013.

MORAES, M. L. P. Amilases. In: SAID (Ed.). **Enzimas como agente biotecnológicos**, 2004. cap. 13, p.222-242.

MUCK, R. E.; NADEAU, E. M. G.; McALLISTER, T. A.; CONTRERAS-GOVEA, F. E.; SANTOS, M. C.; & KUNG Jr, L. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. **Journal of dairy science**, v. 101, n.5, p. 3980-4000, 2018.

NELSON, D. L. & COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: W.H. Freeman & Co., 2005, 1119p.

NIGAM, P.; SINGH, D. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 9, p. 770–778, 1995.

NITSAN, Z.; BEN-AVRAHAM, G.; ZOREF, Z.; NIR, I. Growth and development of the digestive organs and some enzymes in broiler chicks after hatching. **British Poultry Science**, v.32, p.515-523, 1991.

NOZIÈRE, P.; STEINBERG, W.; SILBERBERG, M.; MORGAVI, D.P. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 2319–2328, 2014.

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).

PEREIRA, K. A., AMARAL, A. G., OLIVEIRA, A. R., ARCANJO, A. H. M., CAMPOS, J. C. D. Aspectos nutricionais e confecção de silagem de grão úmido de milho para a alimentação de bovinos: revisão de literatura. *Nutritime Revista Eletrônica*, on-line, Viçosa, v. 14, n. 1, pag. 4944-4953, jan./ fev. 2017.

PEREIRA, M. N.; PEREIRA, R.A.N.; BITENCOURT, L. L.; DIAS JUNIOR, G. S.; LOPES, N. M. e ZACARONI, O. F. Silagem de milho rehidratado na alimentação do gado leiteiro. *Informe Agropecuário (Belo Horizonte)*, v. 34, p. 27-33, 2013.

PEREIRA FILHO, I. A. **Cultivo do Milho**. Embrapa Sistemas de Produção. 9º ed. Brasília, DF, Brasil, 2015.

PARREIRA FILHO, J. M.; FERNANDES, E.A.; GUIMARÃES, R.F.M.; OLIVEIRA, C.B.; FREITAS, B.B.B; SANTANA, L. F.; FUDIMOTO, C.; PARREIRA, I.F.B.; OLIVEIRA, P.M.L. Substituição do milho pelo sorgo sobre o desempenho zootécnico e na digestibilidade em coelhos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.72, n.3, p.993-999, 2020.

PEREIRA, M.L.R.; LINO, F.A.; MELO, A.U.F.; NETO, M.D.F.; LIMA, D.A.; FERNANDES, J.J.R; ARNHOLD, E. Degradabilidade de grão reconstituído de milho e sorgo ensilados com diferentes granulometrias. In: XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, INOVAÇÕES TECNOLÓGICAS E MERCADO CONSUMIDOR, 3, 2011. Maceió. Anais... Maceió: Universidade Federal de Alagoas, 2011.

PEREIRA NETO, M.; MACIEL, F. C.; VASCONCELOS, R. M. J. **Produção e uso de silagens**. Natal: EMPARN, 2009, 30 pp.

PESSOA, G.B.S. Avaliação de complexo enzimático em dietas de frangos de corte. 2010. 75f. Dissertação (Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa. 2010.

PRADYAWONG, S., JUNEJA, A., SADIQ, M., NOOMHORM, A., & SINGH, V. **Comparison of Cassava Starch with Corn as a Feedstock for Bioethanol Production**. *Energies*, v. 11, n. 12, p. 3476, 2018.

PRESTES, I. D.; ROCHA, L. O.; NUÑEZ, K. V.; SILVA, N. C. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. **Scientia Agropecuaria**, v. 10, n. 4, p. 559-570, 2019. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.13>

QUEIROZ, C., and SOUSA, A. C. B. de. (2020). Production of hydrolytic enzymes by filament fungi in different solid substrates. *Brazilian Journal of Development*, vol. 6, n. 7, p. 51849–51860. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-725>

RABELO, C. G.; SOUZA, L. H.; OLIVEIRA, F. G. Análise dos custos de produção de silagem de milho: estudo de caso. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 9, n. 2, p. 8-15, 2017.

RANILLA, M.J., TEJIDO, M.L., GIRALDO, L.A., TRICÁRICO, J.M., CARRO, M.D. Effects of an exogenous fibrolytic enzyme preparation on in vitro ruminal fermentation of three forages and their isolated cell walls. *Animal Feed Science Technology*, vol.145, n. 1-4, pag. 109–121, 2008.

RAO, M. B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S. and DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 597-635, 1998.

REIS, R. A.; RABELO, C. H. S.; JOBIM, C C; LARA, E. C. An overview about the role of silage inoculants in Brazil: a good strategy to improve the silage quality. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 52, 2015, Belo Horizonte. **Anais...** Brasília: SBZ, 2015. p.1-43.

REZENDE, A. V.; RABELO, C. H. S.; VEIGA, R. M.; ANDRADE, L. P.; HÄRTERB, C. J.; RABELO, F. H. S.; BASSO, F. C.; NOGUEIRAD, D. A.; REIS, R. A. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science and Technology**. v. 197, p. 213–221, 2014.

ROSEIRA, J. P. S. **Silagens de sorgo tratadas com cepas autóctones de *Lactobacillus buchneri* e uso de protease exógena em grãos de milho e sorgo reidratados e ensilados**. 2019. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa. 64 p.

ROSTAGNO, H. S. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3.ed. Viçosa:UFV, 2011. 252p.

SANTOS, G.R.R.M. **Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de *Xanthomona saxonopodis* pv. citri**. Tese (Mestrado em Biotecnologia) São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 77 p. 2007.

SAYLOR, B. A.; CASALE, F.; SULTANA, H.; FERRARETTO, L. F. Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. *Journal of Dairy Science*, v. 103, n. 1, 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16831>.

SILVA, J. A. M. et al. Digestibilidade aparente dos nutrientes e energia de ração suplementada com enzimas digestivas exógenas para juvenis de tambaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier, 1818). **Acta Amazonica**, 2007, 37: 157-163. <https://doi.org/10.1590/S0044-59672007000100021>

SILVA, J.S.; BORGES, A.L.C.C.; LOPES, F.C.F.; SILVA, R.R.; VIEIRA, A.R.; DUQUE, A.C.A.; BORGES, I.; RODRIGUES, J.A.S.; GONÇALVES, L.C. Degradabilidade ruminal in situ do sorgo grão em diferentes formas de reconstituição. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1822–1830, 2014.

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 filamentoso *Aspergillus nidulans***. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 30, n. 3, p. 700–705, 2010.

SOUZA, C. G.; MOURA, A. K. B.; SILVA, J. N. P.; SOARES, K. O.; SILVA, J. V. C., & VASCONCELOS, P. C. Fatores antinutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função dos compostos secundários. **Pubvet**, v. 13, p. 166, 2019. <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n5a327.1-19>

STIVARI, T. S. S., et al. Aditivos enzimáticos na alimentação de ruminantes: estratégia para a produção animal. **Pubvet**, v. 8, n. 11, Ed. 260, 2014.

TANG, S.X.; TAYO, G.O.; TAN, Z.L.; SUN, Z.H.; SHEN, L.X.; ZHOU, C.S.; XIAO, W.J.; REN, G.P.; HAN, X.F.; SHEN, S.B. Effects of yeast culture and fibrolytic enzyme

supplementation on in vitro fermentation characteristics of low- quality cereal straws. *Journal of Animal Science*, v.86, p. 1164-1172, 2008.

TESTER, R. F.; KARKALAS, J.; QI, X. Starch - composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, v. 39, n. 2, p.151-165, 2004.

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.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. ^a Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Animal Feed Science and Technology*. v. 145, p 136-150, 2008.

VANIER, N. L.; VAMADEVAN, V.; BRUNI, G. P.; FERREIRA, C. D.; PINTO, V. Z.; SEETHARAMAN, K.; ZAVAREZE, E. R.; ELIAS, M. C.; BERRIOS, J. D. J. Extrusion of Rice, Bean and Corn Starches: Extrudate Structure and Molecular Changes in Amylose and Amylopectin. *Journal of Food Science*, v. 81, n. 12, p. E2932–E2938, 2016.

YANG, W. Z.; SON, Y. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of Exogenous Enzymes on Ruminal Fermentation and Degradability of Alfalfa Hay and Rice Straw. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v.24, n.1, p.56-64, 2011.

YOUNG, K. M.; LIM, J. M.; DER BEDROSIAN, M. C. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. *Journal of Dairy Science*, v.95, n.11, p.6687- 6694, 2012.

ZHAO, F., REN, W., ZHANG, A., JIANG, N., LIU, W., & WANG, F. Effects of different amylose to amylopectin ratios on rumen fermentation and development in fattening lambs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 31, n. 10, p. 1611–1618, 2018.

CAPÍTULO II

PROTEASE EM SILAGEM DE GRÃO DE MILHO REIDRATADO – CARACTERÍSTICAS DA SILAGEM, DIGESTÃO E METABOLISMO ANIMAL

Artigo a ser submetido à revista Animal and feed science technology

Protease em silagem de grão de milho reidratado – Características da silagem, digestão e metabolismo animal

Jamille Débora O. B. Rodrigues*, Jefferson R. Gandra **

*Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Rod. Dourados - Itahum km 12, Dourados – MS, Brasil. 79804-970.

** Instituto de Estudos em Desenvolvimento Agrário e Regional, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus III, Rod. BR-230 (Transamazônica), Loteamento Cidade Jardim, Av. dos Ipês, s/n.º - Cidade Jardim, Marabá – PA, Brasil. 68500-000.

¹**Autor correspondente:** jamilledeboraob@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a adição de protease e amilase em silagem de grão úmido de milho reidratado. No *Experimento 1*, 30 silos experimentais foram preparados e durante 45 dias ficaram vedados. Os silos foram distribuídos aleatoriamente em 5 tratamentos: 0 (controle), 250, 500, 750 e 1000g de protease por tonelada de milho reidratado (CINBENZA DP100®, extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). Além das enzimas, foi adicionado o inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4×10^{10} g/UFC + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6×10^{10} g/UFC – a uma dose de 4 g/t de matéria fresca em todos os silos. Foram avaliados o valor nutricional, as perdas fermentativas, a estabilidade aeróbica, perfil microbiológico e fermentativo e a cinética ruminal em todos os silos. No *Experimento 2*, 5 ovinos mestiços foram alojados em gaiolas metabólicas em delineamento em quadrado latino 5x5. Durante 70 dias, os animais consumiram silagem produzida de acordo com os tratamentos do *Experimento 1*. Além das silagens experimentais, os animais recebiam feno de *Cynodon ssp.* e uma

mistura proteica mineral. Foram avaliados o consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes, a fermentação ruminal e o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana. Comparando os tratamentos enzimáticos ao controle, foi possível observar que a inclusão de enzima aumentou a composição da MS, PB e do amido e reduziu o FDN. A inclusão de protease diminuiu as perdas e aumentou a recuperação. A temperatura ambiente dos silos reduziu nos tratamentos controle, 250 e 500 (g/ton). Para o pH, os tratamentos 750 e 1000 (g/ton) apresentaram melhor estabilidade ao longo do período de avaliação. Para o perfil microbiológico e fermentativo dos silos a inclusão de protease trouxe efeitos positivos especialmente nos tratamentos 500 e 750 (g/ton). A digestibilidade apresentou comportamento quadrático para o amido e com relação a fermentação ruminal, foi observado comportamento quadrático para propionato e butirato. Foi observado efeito apenas para a síntese microbiana (g/dia), com nitrogênio e proteína bruta apresentando comportamento quadrático. De acordo com as equações de regressão, o nível ótimo de inclusão de protease seria de 427 g/ton.

Palavras-chaves: amido, enzima exógena, estabilidade

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the addition of protease and amylase in moist rehydrated corn grain silage. In *Experiment 1*, 30 experimental silos were prepared and were sealed for 45 days. The silos were randomly distributed into 5 treatments: 0 g of protease (control); 250 g of protease; 500 g of protease; 750g of protease and 1000g of protease per ton of moist rehydrated corn (CINBENZA DP100®, enzymatic extract of *Bacillus licheniformis*, protease activity 600 IU/g). In addition to the enzymes, the bacterial inoculant, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brazil) – *Lactobacillus plantarum* 4*10¹⁰ g/CFU + *Propionibacterium acidipropionici*

2.6*10¹⁰ g/CFU – at a dose of 4 g/t was added of fresh matter in all silos. The nutritional value, fermentative losses, aerobic stability, microbiological and fermentative profile and ruminal kinetics were evaluated in all silos. In *Experiment 2*, 5 crossbred sheep were housed in metabolic cages in a 5x5 latin square design. For 70 days, the animals consumed silage produced according to the treatments of *Experiment 1*. In addition to the experimental silages, the animals received hay from *Cynodon* ssp. and a mineral protein blend. Intake and digestibility of dry matter and nutrients, ruminal fermentation and nitrogen balance and microbial protein synthesis were evaluated. Comparing the enzymatic treatments to the control, it was possible to observe that the inclusion of enzyme increased the DM, CP and starch composition and reduced the NDF. The inclusion of protease decreased losses and increased recovery. The ambient temperature of the silos reduced in the control treatments, 250 and 500 (g/ton). Treatments 750 and 1000 (g/ton) showed pH stability throughout the evaluation period. For the microbiological and fermentative profile of the silos, the inclusion of protease brought effects especially in the treatments 500 and 750 (g/ton). Digestibility showed a quadratic behavior for starch. For ruminal fermentation, quadratic behavior was observed for propionate and butyrate. An effect was found only for microbial synthesis (g/day), with nitrogen and crude protein presenting a quadratic behavior. Thus, according to the regression equations the optimum protease inclusion is 427 g/ton.

Key-words: starch, exogenous enzyme, stability

1. INTRODUÇÃO

Grande parte da importância econômica e nutricional do milho (*Z. mays*) é caracterizada pela sua diversificada utilização, fazendo dele uma das culturas mais importantes no mundo, amplamente utilizado para consumo humano e na alimentação

animal (Prestes et al., 2019). No caso da alimentação animal, juntamente com o farelo de soja, o milho tem sido o principal insumo utilizado (Embrapa Milho e Sorgo, 2014). Ele apresenta um elevado conteúdo de carboidratos, principalmente amido, e, por isso, é fundamentalmente utilizado como fonte energética na composição de dietas (Faustino et al., 2020).

O valor nutritivo e a elevada produtividade do grão de milho conseguem atender as exigências dos rebanhos mais exigentes, tornando-o uma cultura padrão para produção de silagem (Paziani et al. 2009). Mas, alguns fatores podem afetar a digestibilidade do amido do grão, dentre os quais podemos destacar: o método de armazenamento, os métodos de processamento de grãos, o tamanho das partículas e o tipo de endosperma (Arcari et al., 2016).

A maioria dos híbridos de milho cultivados no Brasil possui alta vitreosidade, que é definida como a porção do amido envolvida por uma densa camada protéica (Faustino et al., 2020). Pensando na melhora dos aspectos relacionados a digestibilidade do milho, as técnicas de processamento têm demonstrado benefícios (Ferraretto; Crump; Shaver, 2013; Prestes et al., 2019) e a ensilagem tem sido uma técnica cada vez mais utilizada, já que permite proteger o material de perdas, reduz a contaminação pela ação de micotoxinas (Eltariki et al., 2018) e diminui o ataque de pragas, que além de danificar o grão, aumentam os níveis de umidade e agem como vetores (Dorn & Jackson-Ziems, 2013; Valmorbida, 2016).

A prática de reidratação dos grãos de milho com água pode ser uma alternativa viável para contornar as dificuldades de utilização do grão colhido com alta umidade (Rezende et al., 2014). Através dela se devolve ao material já seco umidade adequada em torno de 30%, para que ele seja fermentado durante a ensilagem (Junges et al., 2017). Assim, é possível estabelecer o teor de umidade ideal, garantir uma boa estocagem do

material, uma fermentação adequada no silo (Pereira et al., 2013), bem como trazer aos produtores uma alternativa para a época em que o cereal é encontrado com valores mais baixos no mercado (Mendes, 2013), além de potencialmente aumentar a digestibilidade do amido (Junges et al., 2017). A silagem de grão de milho reidratado e a silagem de grão úmido convencional tem suas qualidades equivalentes, pois a fermentação que ocorre após a ensilagem quebra as prolaminas (Mendes, 2013).

Porém, as silagens de grão úmido são materiais mais instáveis (Muck et al., 2018), e no intuito de melhorar a utilização dos alimentos pelos animais, estudiosos tem se atentado cada vez mais para o uso de enzimas na nutrição animal (Faustino et al., 2020). Enzimas amilolíticas e proteolíticas têm sido estudadas com particular interesse em melhorar a degradabilidade do amido no rúmen, uma vez que a primeira atua quebrando a estrutura do amido em partículas menores, e a segunda reduz a proteção da matriz protéica presente nos grânulos de amido sobre a ação dos microrganismos ruminais, resultando em peptídeos ou aminoácidos livres (Silva et al., 2018).

Mas, estudos sobre a utilização dessas enzimas em silagens de cereais ainda são escassos, e o uso desses produtos poderia melhorar o valor nutritivo das silagens (Young et al., 2012). Dessa forma, mais estudos são necessários para um melhor entendimento das peculiaridades da fermentação que ocorre nesse alimento (Moraes et al., 2017) e dos efeitos da adição de enzimas a dieta animal, visto as silagens de cereais estão entre os principais alimentos utilizados na nutrição de ruminantes no Brasil (Bernardes & Rêgo, 2014). Face ao exposto, foi conduzido estudo para avaliar a adição de protease em silagem de grão de milho reidratado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Experimento 1

Este experimento foi conduzido no período de agosto a setembro de 2019, no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II Dourados, MS. A Grande Dourados está situada na latitude 22°11'38,78260" S, longitude 54°55'49,44655" W e altitude de 478,626 metros, segundo o Sistema Geodésico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018).

Preparo da silagem

Foram utilizados nesse experimento grãos de milho Biomatrix BM 3066 Pro, colhidos durante a safra 2018/2019. Após a colheita, os grãos foram moídos em moinhos de facas (4 mm), reidratados, na proporção de 30 litros de água para cada 100 quilos de milho, e homogeneizados. Os silos experimentais foram feitos em tubos de polietileno de 40 cm de altura e 20 cm de diâmetro. No fundo dos silos, foi colocado areia seca (1 kg) separada da forragem por um tecido de náilon para quantificação do efluente produzido.

Trinta silos experimentais foram preparados e distribuídos aleatoriamente em cinco tratamentos: 1- 0 (Controle - sem adição de enzimas), 250, 500, 750 e 1000 g/ton de grão úmido reidratado (CINBENZA DP100®, extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). Foi adicionado o inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4*10¹⁰ UFC/g + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6*10¹⁰ UFC/g – a uma dose de 4 g/t de matéria fresca em todos os tratamentos.

Antes do preparo dos silos experimentais, uma amostra de cada silo (porção superficial, meio e inferior) foi retida e homogeneizada 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). Os silos experimentais foram alocados em um galpão e ficaram vedados durante 45 dias.

Valor nutricional

Os silos foram abertos após os 45 dias de fermentação e amostras compostas foram coletadas e levadas para pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 65° C por 72h. Após este período foram moídas em moinho do tipo Willey a 1 mm, e secas em estufa a 105° C para determinar a matéria seca (MS, método 950.15), cinza (método 942.05), matéria orgânica (MO, 100-cinzas), proteína bruta (PB, N × 6.25, método Kjeldahl 984.13) e extrato de etéreo (EE, método 920.39), (AOAC, 2000). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest; Robertson; Lewis (1991) e o teor de amido conforme metodologia descrita por Hendrix (1993).

Perdas fermentativas

Os silos foram pesados, para determinação das perdas por gases e, em seguida, abertos. As perdas por gases foram calculadas de acordo com a equação a seguir:

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

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

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

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

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

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

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

em que: MSf = quantidade de MS final; MSi = quantidade de MS inicial (Jobim et al., 2007).

Estabilidade aeróbia

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

e a umidade relativa do ar com termo-higrômetro digital. A estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto, em horas, para a massa de forragem elevar em 1°C em relação à temperatura do ambiente (Driehuis et al., 2001). Para a determinação do pH das silagens, uma amostra de cada silo era retirada nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, colocada em água destilada e através de um potenciômetro, mensurado (Kung Jr. et al., 1984). Para a determinação dos teores de MS retirou-se $\pm 100\text{g}$ do material ensilado nas horas 0, 24, 48, 72, 96 e 120 que posteriormente foram colocados em estufa a 105° por 24 horas (método 950.15; AOAC, 2000). As perdas na massa ensilada foram calculadas pela diferença no conteúdo de MS inicial e final dos silos, em relação à quantidade de MS da forragem ensilada, conforme equação descrita por Jobim et al., (2007).

Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Silva et al. (1997) nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As amostras de silagem de milho reidratadas (10 g) foram diluídas em solução de cloreto de sódio esterilizada (9 g/l, 90 ml). A partir desta suspensão bacteriana, foi obtida a diluição de 10^{-2} , retirando uma alíquota de 1 ml e adicionando em um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) e homogeneizado em vórtex. O processo foi repetido até a diluição de 10^{-6} .

Cada amostra foi triplicada, e através das diluições decimais em placas de Petri foi feita a contagem de microrganismos. Para as bactérias do ácido láctico foi utilizado o método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) no meio de cultura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 48 horas. Para análise de bactérias aeróbias, foi utilizado o método de plaqueamento em gotas (*drop plate*) e para as anaeróbias facultativas o método utilizado foi de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) no meio de cultura PCA (Plate Count Ágar). As placas foram

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

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

Perfil fermentativo

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

Cinética de degradação ruminal da matéria seca

Foram utilizados três animais F1 Holandês x Zebu, canulados no rúmen, com peso médio de 450 ± 30 kg, alimentados duas vezes ao dia (07:00 e as 15:00 horas) com feno de gramíneas de *Cynodon* sp. (12%), e o concentrado composto por silagem de grão reidratado (68%), uma mistura protéica mineral (20%), contendo a relação volumoso: concentrado de 12:88. Os animais passaram por um período de adaptação de 10 dias.

Para avaliação da cinética ruminal, foram pesadas cinco gramas de cada amostra, após elas serem moídas (2mm), e colocadas em sacos de TNT ($100\text{g}/\text{cm}^2$), medindo 4x5 cm, respeitando a relação 20 mg/cm². Após, colocou-se em sacolas de filó, medindo 15 x 30 cm, com seis repetições, juntamente com pesos de chumbo de 100g. As sacolas foram amarradas com fio de nylon, deixando comprimento livre de 1 metro para que elas tivessem livre movimentação nas fases sólidas e líquidas do rúmen. As amostras foram preparadas segundo as recomendações propostas por Huntington e Givens (1995) e Nocek (1988) e então foram então depositadas na região do saco ventral do rúmen por tempo de incubação na ordem inversa (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas) para serem retirados todos ao mesmo tempo do rúmen, ao final do período, e desta forma, promover lavagem uniforme do material em água corrente até a água ter aparência translúcida.

Em seguida, os saquinhos lavados foram colocados em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. Os sacos referentes ao tempo zero, para determinar a fração solúvel, foram introduzidos na massa ruminal e imediatamente retirados, recebendo, o mesmo tratamento destinado aos demais tempos. Os resíduos remanescentes nos sacos de TNT, recolhidos no rúmen foram analisados quanto aos teores de MS, (método 950.15) de acordo a AOAC (2000). A porcentagem de degradação foi calculada pela proporção de alimentos remanescentes nos sacos após a incubação ruminal.

Os dados obtidos foram ajustados para uma regressão não linear pelo método de Gauss-Newton (Neter et al., 1985), por meio do software SAS (SasInstitute, NC, Cary), conforme a equação proposta por (Orskov & McDonald, 1979)

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:

$$Y_i = \mu + E_i + e_i \text{ onde:}$$

Y_{ijklm} = variável dependente, μ = média geral, E_i = efeito de protease ($i = 1$ a 5), e e_i = erro.

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). Os dados foram avaliados por regressão polinomial simples, adotando-se nível de significância de 5%.

Na estimativa dos parâmetros da cinética de degradação da MS, foram utilizados o modelo assintótico de primeira ordem, proposto por Orskov e McDonald (1979): $Y = a + b(1 - e^{-ct})$. Onde: Y = degradação acumulada do componente nutritivo analisado após o tempo t ; a = intercepto de curva de degradação quando $t = 0$, que corresponde à fração solúvel em água do componente nutritivo analisado; b = potencial da degradação da fração insolúvel em água do componente nutritivo analisado; $a+b$ = degradação potencial do componente nutritivo analisado quando o tempo não é fator limitante; c = taxa de

degradação por ação fermentativa de b; t = tempo de incubação. A fração considerada indegradável foi calculada da seguinte forma: $I = (100 - (a+b))$.

Depois de calculados, os coeficientes a, b e c foram aplicados à equação proposta por Orskov & McDonald (1979), para a estimativa da degradabilidade efetiva (DE), utilizando o modelo matemático: $DE = a + [(b * c) / (c + K)]$. Em que K = taxa de passagem de sólidos pelo rúmen, definida aqui como sendo de 4, 8 e 12%/h conforme sugerido pelo AFRC (1993), que pode ser atribuído ao nível de consumo alimentar baixo, médio e alto. Após os dados serem ajustados ao modelo e utilizando o valor de desaparecimento obtido no tempo zero (“a”), foi estimado o tempo de colonização (TC) para a MS, PB e FDN, da mesma forma que Goes et al. (2010), em que os parâmetros “a”, “b”, e “c” foram estimados pelo algoritmo de Gaus Newton: $TC = [-\ln(a'-a-b)/c]$.

Experimento 2

Este experimento foi conduzido no período de setembro a dezembro de 2019, no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II Dourados, MS. A Grande Dourados está situada na latitude 22°11'38,78260" S, longitude 54°55'49,44655" W e altitude de 478,626 metros, segundo o Sistema Geodésico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018).

Animais, instalações e dietas

Cinco ovinos mestiços foram distribuídos aleatoriamente em delineamento DQL 5x5. A dieta fornecida foi formulada com ganho médio diário de 200 g, utilizando o *Small Ruminants Nutritional System* (SRNS) e continha a relação volumoso:concentrado de 37:63. O volumoso fornecido foi feno de *Cynodon spp.* (37%), e o concentrado composto

por silagem de grão reidratado (38%) e uma mistura proteica mineral (25%). Essa mistura, constituída de grão de soja moído (88%) e mistura mineral (12%).

Os cinco ovinos e cada quadrado foram distribuídos aleatoriamente de acordo com as seguintes dietas experimentais: 1- 0 g de protease / ton de milho úmido reidratado (Controle); 2- 250 g de protease/ ton de milho úmido reidratado; 3- 500 g de protease/ ton de milho úmido reidratado; 4- 750 g de protease/ ton de milho úmido reidratado e 5- 1000g de protease/ ton de milho úmido reidratado (CIBENZA DP100®, extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). O período experimental total foi de 70 dias. Cada período experimental tinha 14 dias, com os últimos quatro dias para coleta de dados e amostragem. Os animais alojados em gaiolas metabólicas, foram alimentados duas vezes ao dia, as 07:00 e as 13:00 horas. Amostras de alimentos e sobras foram coletadas diariamente durante o período de amostragem e reunidas em uma amostra composta para análises químico-bromatológicas subsequentes.

Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes

Diariamente foram feitas pesagens da quantidade de alimentos, concentrado e das sobras de cada tratamento com a finalidade de estimativa do consumo. Para a avaliação do consumo, as sobras da dieta foram pesadas diariamente sendo ajustado o fornecimento para um consumo *ad libitum* com sobras calculadas em 10 a 15%.

Para a digestibilidade da matéria seca e nutrientes foram realizadas coleta total de fezes por 72 horas. As amostras obtidas foram homogeneizadas para compor uma amostra composta de cada animal em cada período experimental. As amostras compostas foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm. Posteriormente estas amostras foram analisadas

quanto a MS, MO, PB, EE, FDN e amido de acordo com a metodologia anteriormente descrita para análise de alimentos.

Fermentação ruminal

No 14º dia de cada período experimental, 4 horas após alimentação foi feita a coleta de líquido ruminal através de sonda esofágica de acordo com Ortolani (1981). Imediatamente após a coleta, o pH foi mensurado através de potenciômetro digital (MB-10, Marte, Santa Rita do Sapucaí, Brasil) (Silva & Queiroz, 2002).

As amostras seguiram para serem centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos. Ao final, 2 ml do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,4 ml de ácido fórmico P.A., arrolhado, identificado e armazenado a -20°C para determinação de AGCC. A análise de AGCC foi feita conforme descrito Erwin et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gás Chromatograph, Marca Finnigan) onde foram colocadas 1µL de amostra e o cromatógrafo integrado a um computador, processava os cálculos de quantificação a partir do software GC solution Shimadzu.

A amônia-N foi determinada pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (Broderick; Kang, 1980).

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Para o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana foi realizada coleta total de urina por 48 horas entre os dias 12 e 13 de cada período experimental. Ao longo das 48 horas, foram coletadas amostras spot durante a micção espontânea, às 11h00, ou seja, quatro horas após o fornecimento da refeição às 07h00. Uma alíquota de 10 ml da urina foi diluída em 40 ml de ácido sulfúrico 0,036 N. Nesse processo, o pH foi ajustado, se necessário, para valores abaixo de 3, com gotículas de concentrado ácido sulfúrico, visando prevenir a destruição bacteriana dos derivados de purina e precipitação do ácido

úrico. As amostras foram armazenadas a -18°C para análises posteriores os derivados da purina alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina.

As análises desses derivados foram realizadas conforme a técnica descrita por Chen; Gomes (1992). Purinas microbianas absorvidas (X , mmol dia $^{-1}$) foram calculados a partir da excreção de derivados de purina (Y , mmol dia $^{-1}$), pela seguinte equação: $Y = 0,84X + (0,150 \text{ BW}^{0,75} - 0,25X)$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados da purina urinária e $0,150 \text{ BW}^{0,75} - 0,25X$ é a contribuição endógena à excreção de purinas (Verbic et al., 1990). O fluxo intestinal dos compostos nitrogenados (Y , g N dia $^{-1}$) foi calculado em função das purinas microbianas absorvidas (X , mmol dia $^{-1}$), usando a seguinte equação: $Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$, em que 70 é o teor de N nas purinas (mg/N mmol); 0,83 é a digestibilidade das microbianas purinas; e 0,116 é a Purina N: bacteriana N. A produção microbiana foi expressa como g N microbiano (gramas de N microbiano) e P microbiano (gramas de proteína microbiana).

Para o balanço de nitrogênio foi calculado o consumo, excreção de nitrogênio da urina e fezes ($N \times 6.25$, método 984.13), (AOAC, 2000). O cálculo foi realizado de acordo com as seguintes fórmulas:

$$N_{\text{absorvido}} = N_{\text{consumido}} - (N_{\text{fezes}})$$

$$N_{\text{retido}} = N_{\text{consumido}} - (N_{\text{fezes}} + N_{\text{urina}})$$

Análise estatística Experimento 2

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 o seguinte modelo:

$Y_{ij} = \mu + P_i + A_j + P_j(A_j) + e_{ijklm}$ onde:

Y_{ijklm} = variável dependente, μ = média geral, A_j = efeito de amilase ($A_i = 1$ a 2), P_j = efeito de protease ($l = 1$ a 2), $Pl(A_m)$ = efeito de interação e e_{ijklm} = erro.

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). Os dados foram avaliados adotando-se nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Valor nutricional

Foi observado o efeito significativo da composição bromatológica dos silos no momento da abertura em função dos tratamentos para a MS, PB, FDN e amido ($P \leq 0.05$; Tabela 2). Comparando os tratamentos enzimáticos ao controle, foi possível observar que a inclusão de enzima aumentou a composição da MS, PB e do amido e reduziu o FDN. Com comportamento linear crescente para a PB, e quadrático para MS, FDN e amido. O ponto ótimo de inclusão de protease para MS seria de 545 g/ton (Tabela 9).

Perdas fermentativas

Foi observado o efeito significativo ($P \leq 0,05$; Tabela 3) das perdas fermentativas em função dos tratamentos em todas as variáveis analisadas: gases (MN), efluente (MN), gases (MS), efluente (MS), total (MS), recuperação (MS). Com comportamento linear decrescente para gases (MS) e total (MS) e linear crescente para recuperação (MS) e quadrático para gases (MN), efluente (MN) e efluente (MS). A inclusão de protease diminuiu as perdas e aumentou a recuperação. Analisando as equações de regressão (Tabela 9), foi observado inclusão ótima de protease de 432, 260 e 415 g/ton respectivamente para perdas de gases (MN) e efluentes (MN e MS). Verificando os níveis de protease independentemente do tempo analisado observamos um efeito linear

decrecente, onde para cada aumento de 1 grama de CIBENZA DP100® à silagem de grão úmido de milho reidratado, há uma redução das perdas totais da grandeza de 0.00486.

Estabilidade aeróbia

As diferenças da temperatura do ambiente e silos experimentais de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio podem ser observadas na Figura 1. Houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) para tratamento, tempo e interação com comportamento quadrático. Além disso, foi possível observar que a temperatura ambiente dos silos reduziu nos tratamentos controle, 250 e 500 (g/ton MN)¹ à medida que o tempo de exposição ao oxigênio aumentou. Quando avaliamos somente os níveis de protease, independentemente do tempo analisado, observamos um efeito quadrático, onde a inclusão ótima de CIBENZA DP100® na silagem de grão úmido de milho foi de 610 g/ton (Tabela 9).

Com relação ao pH de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio, é possível observar na Figura 2 que houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) para tratamento, tempo e interação com comportamento linear. Onde, o pH subiu a partir das 48h de exposição ao oxigênio para os tratamentos controle e 250 (g/ton MN) e a partir das 72h para o tratamento 500 (g/ton MN). Os tratamentos 750 e 1000 g/ton apresentaram estabilidade de pH ao longo de todo o período de avaliação. Verificando os níveis de protease independentemente do tempo analisado observamos um efeito linear decrescente, onde para cada aumento de 1 grama de CIBENZA DP100® à silagem de grão úmido de milho reidratado, há uma redução de pH da grandeza de 0.00164.

Perfil microbiológico e fermentativo

Com relação ao perfil microbiano e fermentativo no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais (Tabela 4) foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) para a população de microrganismos em todas as variáveis analisadas, com comportamento quadrático. Também foi observada diferença estatística ($P \leq 0,05$) para o perfil fermentativo com comportamento linear crescente para o pH e N-NH₃ (mg/dl). Com relação aos ácidos graxos em mmol/kg MS, foi observada diferença estatística ($P \leq 0,05$) para etanol, isobutirato, valerato, isovalerato e AGCC com comportamento quadrático. Adicionalmente os valores ótimos de inclusão de protease para etanol, isobutirato, valerato e AGCR são respectivamente 236; 358; 504 e 177 (g/ton MN) (Tabela 9).

Para a população de fungos e mofos de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio (Figura 3), foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) para tratamento, tempo e interação com comportamento quadrático. Onde a população de fungos e mofos aumentou a partir das 72h de exposição ao oxigênio nos tratamentos 0, 250, 500 e 750 (g/ton MN)¹ e reduziu no tratamento 1000 (g/ton MN)¹. Analisando os níveis de protease independentemente do tempo analisado observamos um efeito quadrático, onde o nível ótimo de inclusão de protease foi de 191 g/ton (Tabela 9).

Para a população de leveduras (Figura 4) foi observada diferença estatística ($P \leq 0,05$) para tratamento, tempo e interação com comportamento quadrático. Onde a população de leveduras subiu até as 72h de exposição ao oxigênio nos tratamentos 0, 500 e 750 (g/ton MN)¹ e diminuiu para o tratamento 250 e 1000. Tendo praticamente estabilizado após as 72h no tratamento 250 (g/ton MN)¹, reduziu no tratamento 0, 250 e 750 e aumentou nos tratamentos 1000 (g/ton MN)¹, até as 144h. Analisando os níveis de

protease independentemente do tempo analisado observamos um efeito quadrático, onde o nível ótimo de inclusão de protease foi de 500 g/ton (Tabela 9).

Cinética ruminal de degradação ruminal da matéria seca

Com relação a degradabilidade das silagens experimentais (Tabela 5), foi observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) para as frações: A onde os níveis de 500, 750 e 1000 (g/ton MN)¹ foram superiores aos demais; B com os níveis 0 (controle) e 250 (g/ton MN)¹ sendo superiores aos demais; A+B com os níveis 500, 750 e 1000 (g/ton MN)¹ sendo superiores aos demais. A degradabilidade efetiva (DE) a 4%, 8% e 12%/h também apresentou significância, com o nível 750 (g/ton MN)¹ sendo superior aos demais.

Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes

Com relação ao consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de acordo com as dietas experimentais (Tabela 6). Não foram observadas diferenças significativas para consumo em nenhuma das variáveis estudadas. Já a digestibilidade apresentou comportamento quadrático para a digestibilidade do amido. O ponto ótimo de inclusão de protease para MS, MO, PB, EE, FDN e Amido seriam de 525, 522, 508, 514, 502 e 511 g/ton, respectivamente (Tabela 9).

Fermentação ruminal

Com relação a fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais foi observada diferença significativa ($P \leq 0,001$) para propionato e butirato (Tabela 7). Ambos com comportamento quadrático. O ponto ótimo de inclusão de protease para propionato e butirato estimado foi 495 e 503 g/ton, respectivamente (Tabela 9).

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

O balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais apresentou resultado significativo ($P \leq 0,001$) apenas na síntese microbiana (g/dia), com nitrogênio e proteína bruta apresentando comportamento quadrático. O ponto ótimo de inclusão de protease para o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana seria de 535 g/ton (Tabela 9).

4. DISCUSSÃO

Valor nutricional

De acordo com Giuberti et al. (2014), a matriz amido-proteína evita a fixação microbiana e a digestão enzimática dos grânulos de amido. No presente estudo, a inclusão da protease a silagem de milho reidratado aumentou a solubilização do amido, com influência sobre a assimilação microbiana deste açúcar, aumentando assim o teor de MS.

Durante a ensilagem, as prolaminas são solubilizadas pelos ácidos formados durante o processo fermentativo, como o ácido lático e ácido acético (Lawton, 2002). Quando se usa enzimas fibrolíticas, a degradação da proteína ligada à parede celular é facilitada, aumentando a digestibilidade da PB (McAllister et al., 2001). Nesse sentido, a inclusão de protease a silagem de milho reidratado pode ter potencializado a solubilização das proteínas de reserva, refletindo sobre o teor de PB.

Usando um método in vitro para rastrear enzimas alimentares, Colombatto et al. (2003a, b) relataram grandes aumentos na degradabilidade de FDN do feno de alfafa e ração total mista (RMT) como resultado da suplementação com um produto enzimático contendo atividade de protease, o que pode explicar a redução deste componente nos tratamentos acrescidos de enzima.

O aumento da atividade enzimática nos silos tratados com enzimas, também pode potencializar a degradação de carboidratos (Oliveira et al. 2019), o que pode ter influenciado o teor de amido das silagens tratadas.

As proteases, na dieta de ruminantes, geralmente não são usadas com o intuito de degradar proteínas, mas sim como aditivos alimentares (não aditivos de silagem) que vão melhorar a digestibilidade do amido, auxiliando os microrganismos no rúmen a driblar a barreira físico-química da matriz amido-proteína (Hoffman et al., 2011). Uma maior disponibilidade do amido e proteína estão associados ao aumento da produção de leite e melhor eficiência alimentar de vacas leiteiras em lactação, por exemplo. Assim, um melhor uso de amido e de proteína são de grande interesse para produtores de leite e pesquisadores da área (Ferraretto et al., 2018).

Perdas fermentativas

Em silagens com alto teor de carboidratos fermentáveis, como no caso das silagens de milho moído reidratado, a atividade microbiana é intensificada, podendo levar a uma perda fermentativa excessiva (Pedroso et al., 2005). Mas, o comportamento geral observado nesse estudo foi a redução das perdas fermentativas e aumento da recuperação (MS) nos tratamentos com enzima, indicando melhorias no valor nutritivo da silagem (Gandra et al. 2021).

Estabilidade aeróbica

O uso de enzimas pode diminuir a estabilidade aeróbia devido à liberação excessiva de WCS, aumentando os açúcares disponíveis que podem ser rapidamente utilizados por microrganismos indesejáveis, como leveduras deteriorantes e bolores (Kung e Muck, 2018). De acordo com Higginbotham et al. (1998) as leveduras geralmente iniciam a deterioração aeróbica, e os bolores continuam o processo de

deterioração, já que as leveduras crescem mais rápido que os bolores, mas toleram menos calor. De todo modo, um aspecto que pode ter refletido positivamente sobre a estabilidade aeróbica nesse estudo, foi a resposta sobre o teor de MS nas silagens tratadas, que levou a um acréscimo da MS, já que um maior teor de MS leva ao aumento da osmolaridade e a redução da atividade de água, inibindo o crescimento de leveduras e bolores (Woolford, 1990; Pahlow et al., 2003). No geral, a manutenção do pH entre 3.5 e 5,0 é fundamental para manutenção do valor nutricional da silagem e não ocorrência de crescimento de microrganismos indesejáveis (Weiss et al., 2003) e encontramos esse efeito nos tratamentos com maiores níveis de protease.

Perfil microbiológico e fermentativo

Hoffman et al. (2011) e Junges et. (2017) relacionam positivamente a degradação da zeína durante a fermentação da silagem à atividade microbiana e à produção de ácidos orgânicos nos silos. As bactérias ácido lácticas, são o principal grupo de bactérias que agem no processo fermentativo (Pahlow et al., 2003). Os fungos são microrganismos estritamente aeróbicos, se compararmos com outros microrganismos presentes na silagem, e apresentam crescimento mais lento comparado aos demais. Embora possam crescer em uma ampla variedade de compostos, raramente são aparentes ou em população suficiente para afetar as medidas brutas da qualidade da silagem até que a silagem tenha sofrido substancial deterioração aeróbica por leveduras e várias bactérias aeróbicas (Muck et al., 2013). O crescimento de fungos e mofos ao longo do período de exposição ao oxigênio é um parâmetro muito importante na avaliação da estabilidade aeróbica, já que os fungos são os principais degradadores de matéria orgânica na presença de oxigênio (Santos e Zanini, 2006). Assim, a presença visual de fungos e mofos é uma indicação de que a silagem está com uma qualidade consideravelmente inferior à do material no momento da ensilagem (Muck et al., 2013).

Enzimas exógenas hidrolisam carboidratos complexos em diferentes produtos (malto-, celo-, e xilo-oligossacarídeos), favorecendo o crescimento microbiano (Zilio et al., 2019). Além disso, o alto teor de umidade da SMR é um fator que facilita a deterioração do material ensilado (Rezende et al., 2014). Mas, no geral a inclusão da protease ajustou o crescimento microbiano de maneira favorável.

Danner et al. (2003) destacaram a concentração de ácido acético como o principal ácido orgânico positivamente associado a menores valores de pH da silagem após exposição aeróbia. Apesar de não ter sido observado efeito significativo sobre a produção desse ácido nos silos experimentais, e, mesmo o pH não tendo se distanciado muito do limite indicado por Van Soest (1994) - 3,7 – 4,2 - houve aumento do pH à medida que se aumentava o nível de protease. À medida que espécies de leveduras que podem utilizar o ácido láctico se desenvolvem aerobicamente, o pH da silagem aumenta. Isso abre caminho para o crescimento de outros microrganismos deteriorantes (aeróbicos), particularmente quando o pH está acima de 4,5 (Muck et al., 2013), como ocorreu no tratamento 1000g/ton de protease.

Considerando que o N-NH_3 é produto de fermentações clostrídicas e não deve ultrapassar de 11-12% do nitrogênio total em silagens bem conservadas (Monteiro et al., 2011), fica evidente que as silagens estudadas apresentaram fermentações adequadas, visto que o valor mais alto para N-NH_3 foi no nível de protease de 1000 (g/ton MN) foi de 0.028%.

No geral, a degradação da zeína durante a fermentação da silagem está positivamente associada à atividade microbiana e à produção de ácidos orgânicos (Hoffman et al., 2011; Junges et al., 2017), que auxiliam no controle da estabilidade após a abertura dos silos.

Cinética ruminal de degradação ruminal da matéria seca

O processo de ensilagem em si, já facilita uma melhor degradação da fração solúvel (A) graças à ação dos ácidos orgânicos que são produzidos durante o processo fermentativo no silo (Stock et al., 1991). Reis et al. (2011) encontraram degradabilidade da fração A do amido de grãos ensilados maior (73,6%) quando comparados aos grãos secos, considerando a textura dentada. As próprias características de vitreosidade dos grãos podem interferir na degradabilidade ruminal, híbridos de textura dura nos quais predominam endospermas de alta vitreosidade podem apresentar acentuada redução na degradabilidade em relação à híbridos de textura dentada (Faustino et al., 2020). A inclusão de níveis maiores de protease a silagem de milho reidratada, aumentou a degradabilidade da fração A, o que pode estar associado a melhora da condição de estabilidade no silo, combinando o desenvolvimento de microrganismos benéficos a manutenção do pH ácido da silagem, que favoreceu a solubilização parcial da matriz proteica dos grãos, com melhor acesso ao amido pelos microrganismos ruminais (Saylor et al., 2020).

Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes

A adição de enzima protease exógena (EPE) em grão seco de destilaria com solúveis (DDGS) resultou em respostas quadráticas na degradabilidade de MS, FDN e FDA. Quando a EPE foi adicionada a ração mista total (RMT) de crescimento e terminação, tendeu a aumentar ($P = 0,07$) a degradabilidade de FDN (Vera et al. 2012). Ao usar um produto onde a enzima proteolítica era originária do mamão (Papain, Dyadic International Inc., Jupiter, FL) e avaliar a degradabilidade *in vitro* do FDN da silagem de milho, Eun & Beauchemin (2007) encontraram melhora de 17% nesse parâmetro (dose = 0,5 mg/g MS;). Ainda nesse estudo, Eun & Beauchemin (2007) relataram um aumento na

digestibilidade do amido ao incubar silagem de milho moída *in vitro*. Já Colobatto et al. (2003 b), ao avaliar uma enzima protease de *Bacillus licheniformis* verificaram que não houve resposta sobre a digestibilidade do amido ruminal *in vitro* (dose = 1,5 mg/g MS).

Estudos já realizados sugerem que a atividade da protease pode desempenhar um papel significativo na degradação da fibra de algumas forragens e concentrados para bovinos, mas isso depende muito do produto utilizado e forma de uso (Vera et al. 2012).

Fermentação ruminal

O aumento da concentração de propionato e butirato pode estar relacionado aos efeitos da protease sobre a degradação das zeínas presentes na matriz proteica do milho, desta forma o amido do milho teve uma maior disponibilidade em ambiente ruminal proporcionando níveis elevados de propionato e butirato pela maior ação bacteriana sobre o substrato em questão.

Os efeitos obtidos pelo processo de ensilagem do grão úmido de milho também refletem no ambiente ruminal, podendo promover redução da relação acetado:propionato, além de elevar a concentração de ácidos graxos voláteis do rúmen (acetato, propionato e butirato) (Itavo et al., 2009).

Dietas à base de grãos possuem certa instabilidade na população microbiana, devido às variações na produção de AGV, diminuição do poder tamponante do rúmen, visto que há menos mastigação e produção de maiores níveis de propionato e butirato (Gobetti et al., 2013). Faustino et al. (2020) demonstraram que os parâmetros de fermentação ruminal e a degradabilidade melhor digestibilidade da matéria seca e degradabilidade da proteína e digestibilidade da matéria orgânica no milho reidratado.

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Devido à maior fermentação do amido, o uso da silagem de grão úmido de milho reidratado potencializado pela ação das proteases resulta em um aumento no fluxo de proteína microbiana para o duodeno (Zinn, 1990). O efeito da potencialização do uso de grão úmido de milho adicionado com proteases proporcionou ótima sincronização de energia e proteína no rúmen. À luz disso, grandes quantidades de nitrogênio e energia são necessárias e devem estar disponíveis para suportar a maior taxa de crescimento bacteriano e fluxo de proteínas para o duodeno. Também permite um melhor aproveitamento da proteína, com melhoras no crescimento/desenvolvimento dos animais além de refletir em uma menor excreção de nitrogênio pelas fezes (JO et al., 2012; ZUO et al., 2015).

5. CONCLUSÃO

A inclusão de protease na silagem de grão úmido reidratado melhorou o seu valor nutritivo, suas características fermentativas, microbiológicas assim como a estabilidade aeróbia dos materiais. E, conforme as equações de regressão, a inclusão ótima de protease estimada é 427 g/ton.

6. REFERENCIAS

- Agricultural And Food Reaserch Council – AFRC. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford: CAB International, 1993,159p.
- Andrade, L. P. 2013. Silagem de grão de milho reidratado com soro de leite e água. 2013. 51 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano.
- AOAC, 2000. Association of official agricultural chemists. Official Method of Analysis. (17th ed).

- Arcari, M. A., Martins, C. M. M. R., Tomazi, T., Gonc, J. L., Santos, M. V. 2016. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 221: 167–173.
- Bernardes, T. F., Rêgo, A. C. 2014. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. *Journal of Dairy Science*, 97(3):1852-1861.
- Broderick, G. A., Kang, J. H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63(1): 64-75.
- Chen X. B., Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. *Rowett Research Institute*, 1(1):1-21.
- Ding, M.I., Koizumi, H., Suzuki, Y. 1995. Comparison of three chromatographic systems determination of organic acids in wine. *Analytical Sciences*, 11: 239–243.
- Dorn, T.W.; Jackson-Ziems, T.A. Grain Storage Management to Minimize Mold and Mycotoxins. 2013. *Papers in Plant Pathology*, Vol. 538, pag. 14-15.
- Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Van Wikselaar, P.G. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri* with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56(4): 330-343.
- Eltariki, F.E.M.; Tiwari, K.; Ariffin, I.A.; Alhoot, M.A. Genetic Diversity of Fungi Producing Mycotoxins in Stored Crops, *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 2018. Vol. 12, n. 4, pag. 1815-1823.
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 44(9):1768-1771.

- Eun, J.-S., and K. A. Beauchemin. 2007. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, n. 6, pag. 2839–2851.
- Faustino, T. F., Dias E Silva, N. C., Leite, R. F. 2020. Utilização de grão de milho reidratado e casca de café na alimentação animal. *Revista Científica Rural*, 22(1): 259-2752. Doi: <https://doi.org/10.30945/rcr-v22i1.371>
- Ferraretto, L. F., Silva Filho, W. I., Fernandes, T., Kim, D. H., Sultana, H. 2018. Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. *Journal of Dairy Science*, 101(5): 4643–4649.
- Ferraretto, L. F., Fredin, S. M., Shaver, R. D. 2015. 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*, 98(10): 7318–7327.
- Ferraretto, L.F., Crump, P.M., Shaver, R.D. 2013 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*, 96(1): 533–550.
- Foldager, J. 1977. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation. Ph.D. thesis, East Lasing - Michigan State University.
- Franzoni, A. P. S. 2012. Efeito do processamento do milho no desenvolvimento do rúmen, desempenho de bezerros e digestibilidade in vitro do grão. 2012. 138p. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- Gobetti, S.T.C., Neumann, M., Oliboni, R., Oliveira, M.R. 2013. Utilização de silagem de grão úmido na dieta de animais ruminantes. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*. Guarapuava (PR), 9(1): 225 – 239.

- Goes, R. H. T. B.; Souza, K.A.; Patussi, R.A.; Cornelio, T.C.; Oliveira, E.R.; Brabes, K. C. S. 2010. Degradabilidade in situ dos grãos de crambe, girassol e soja, e de seus coprodutos em ovinos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 32 (3): 271-277.
- Hendrix, D. L. 1993. Rapid Extraction And Analysis Of Nonstructural Carbohydrates In Plant-Tissues. *Crop Science*, 33: 1306–1311.
- Higginbotham, G.E.; Muller, S.C.; Bolsen, K.K.; DePeters E.J. Effects of inoculants containing propionic acid bacteria on fermentation and aerobic stability of corn silage. 1998. *Journal of Dairy Science*, v.81, p.2185-2192.
- Huntington, J.A.; Givens, D.I. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Review (Serie B)*, 65 (2): 63-93.
- Ítavo, C. C. B. F.; Moraes, M.G. ; Ítavo, L. C. V. ; Souza, A. R. D. L. de ; Davy, F. C. A.; Biberg, F. A.; Alves, W. B.; Santos, M. V. dos. 2009. Consumo e digestibilidade de nutrientes de dietas com silagens de grãos úmidos de milho ou sorgo, em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 61, p. 452-459.
- Jobim, C. C. et al. 2007. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 36: 101–119.
- Jo, J. K., Ingale, S. L., Kim, J. S., Kim, Y. W., Kim, K. H., Lohakare, J. D., Lee, J. H. and Chae, B. J. 2012. Effects of exogenous enzyme supplementation to corn and soybean meal-based or complex diets on growth performance, nutrient digestibility, and blood metabolites in growing pigs. *Journal of Animal Science*, v. 90, n. 9, p. 3041-3048.
- Jobim, C.C., Branco, A.B., Santos, G.T. 2003. Silagem de Grãos Úmidos na Alimentação de Bovinos Leiteiros. In: V Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite. Goiania – GO, pp. 357-376.

- Junges, D., Morais, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G., Daniel, J. L. P. 2017. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *Journal of Dairy Science*, 100(11): 9048–9051.
- Kulasek, G. 1972. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. *Polskie Archiwum Weterynaryjne*, 15(4): 801-810,
- Kung JR, L. 2018. Silage fermentation and additive. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 26(3-4).
- Kung, L., Grieve, D. B., Thomas, J. W., Huber, J. T. 1984. Added Ammonia or Microbial Inocula for Fermentation and Nitrogenous Compounds of Alfalfa Ensiled at Various Percents of Dry Matter. *Journal of Dairy Science*, 67(2): 299–306.
- Mendes, I. A. P. 2013. Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagem de grão de milho moído reidratado substituindo milho seco moído do concentrado. 54pp. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- Monteiro, I. J. G., Abreu, J. G., Cabral, L. D. S., Ribeiro, M. D., Reis, R. H. P. 2011. Silagem de capim-elefante aditivada com produtos alternativos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 33(4): 347-352.
- Moraes, G., Daniel, J. L. P., Kleinshmitt, C., P. A. Carvalho., J. Fernandes., L. G. Nussio. 2017. Additives for grain silages - A review. *Slovak Journal of Animal Science*, 50(1): 42–54.
- Muck, R., Weinberg, Z. G., Contreras-Govea, F. E. 2013. Silage extracts used to study the mode of action of silage inoculants in ruminants. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 108-114. DOI: <https://doi.org/10.23986/afsci.6717>.

- Muck, R. E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C., & Kung, L. 2018. Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 5, p. 3980–4000.
- Neter, J., Wasswram, W., Kutner, M. H. 1985. *Applied linear statistical models: Regression. Analysis of Variance, and Experimental Designs*, 2nd Edition, Homewood: Richard D.
- Nocek, J. E. 1988. In situ and others methods to estimate ruminal protein and energy digestibility. *Journal of Dairy Science*, 71 (8): 2051-2069.
- NRC. 2001. *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., Da Silva, M. S. J., Gandra, E. R. S., Pereira, T. L., Gandra, J. R. (2019). Effects of exogenous amylolytic enzymes on silage fermentation, nutritive value, and digestibility of rehydrated corn. *Animal Feed Science and Technology*. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.03.
- Orskov, E.R., McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92(1): 499-503,
- Ortolani, E. L. 1981. Considerações técnicas sobre o uso da sonda esofágica na colheita do suco de rúmen de bovinos para mensuração do pH. *Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, 33(2): 269-275.
- Owens F.N., Secrist D.S., Hill W.J., Gill. R. 1998. Acidosis in cattle: A review. *Journal of Animal Science*. v.76, p.275-86.
- Owens, F.N. et al. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 75: 868-79.

- Paes, M. C. D. 2006. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 6p. (Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica,75).
- Pahlow, G. et al. Microbiology of Ensiling. 2003. In: Dwayne R. Buxton; Richard E. Muck; Joseph H. Harrison. (Ed.). Silage science and technology. Madison, Wisconsin - USA: American Society of Agronomy, Inc.; Crop Science Society of America, Inc.; Soil Science Society of America, Inc., p. 31–93.
- Paziani, S. F.; Duarte, A. P.; Nussio, L. G.; Gallo, P. B.; Bittar, C. M. M.; Zopollatto, M.; Reco, P. C. 2009. Características agrônômicas e bromatológicas de híbridos de milho para produção de silagem. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 38, n. 3, p. 411-417.
- Pereira, M. N., Von Pinho, R. G., Bruno, R. G. S., Calestine, G. A. 2004. Ruminant degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. Scientia Agricola, 61(4):358-363.
- Pedroso, A.F. et al. 2005. Fermentation and epiphytic microflora dynamics in sugar cane silage. Scientia Agricola, 62(5): 427–432.
- Prestes, I. D., Rocha, L. O., Nuñez, K. V., Silva, N. C. 2019. Principais fungos e micotoxinas em grãos de milho e suas consequências. Scientia Agropecuaria, v. 10, n. 4, p. 559-570, <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2019.04.13>
- Reis, W.; Ciniro, C.; Meirelles, P. R. L.; et al. 2011. Degradabilidade do amido de grãos secos e ensilados de híbridos de milho com textura dura e dentada em função do grau de moagem. Boletim de Indústria Animal, v.68, n.2, p.139-149.
- Rodrigues, P. H. M. et al. 2012. Effects of microbial inoculants and amino acid production by-product on fermentation and chemical composition of sugarcane silage. Revista Brasileira de Zootecnia. 41(6): 1394–1400.
- Saylor, B. A., Casale, F., Sultana, H., Ferraretto, L. F. 2020. Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminal in situ starch

- degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. *Journal of Dairy Science*, 103(1).
- Silva, D.J., Queiroz, A.C. 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3ed. Viçosa Universidade Federal de Viçosa, 235p.
- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A. 1997. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 295p.
- Stock, R. A., Sindt, M. H., Cleale, R. M., Britton, R. A. 1991. High-moisture corn utilization in finishing cattle. *Journal of Animal Science*, 69(4): 1645-1656.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Science*. 18: 104–111.
- Valmorbida, R. 2016. *Fungos e micotoxinas em grãos de milho (Zea mays l.) e seus derivados produzidos no estado de Rondônia, Região Norte do Brasil*. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em Ciência dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10): 3583-3597.
- Van Soest, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant* Corvallis: O&B Books, 1994. 476p.
- Verbic, J., Chen, X.B., Macleod, N.A., Orskov, E. R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science*, 114(3): 243-248.
- Young, K. M., Lim, J. M., Der Bedrosian, M. C. et al. 2012. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. *Journal of Dairy Science*, 95(11): 6687- 6694.

- Wang, P., Johnston, D.B., Rausch, K.D. et al. 2009. Effects of protease and urea on a granular starch hydrolyzing process for corn ethanol production. *Cereal Chemistry*, 86(3): 319-322.
- Zilio, E. M. C.; Del Valle, T. A. ; Ghizzi, L. G. ; Takiya, C. S. ; Dias, M. S. S. ; Nunes, A. T. ; Silva, G. G. ; Renno, F. P. 2019. Effects of exogenous fibrolytic and amylolytic enzymes on ruminal fermentation and performance of mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 102, p. 1-11, 2019
- Zinn, R.A. 1990. Influence of flake density on the comparative feeding value of steam-flaked corn for feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 67: 767.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes e composição química da ração.

	Dieta
Ingredientes (g/kg)	
Feno de Tifton	370
Silagem de milho reidratado	380
Grão de soja cru	220
Núcleo mineral ¹	30
Composição nutricional (g/kg MS)	
Matéria seca	761
Matéria orgânica	906
Proteína bruta	139
Extrato etéreo	57.7
Amido	323
Fibra em detergente neutro	325
Fibra em detergente ácido	145
Lignina	35.3
Carboidrato não-fibroso	392
Cinzas	94.4
Nutrientes digestíveis totais	712
Energia líquida de ganho, MJ/kg	6.78

¹Composição: 134 g Ca, 60 g P, 10 g Mg, 110 g Na 12 g S, 30 mg Se, 60 mg I, 150 mg Co, 6,000 mg Zn, 2,500 mg Fe, 4,500 mg Mn.

Tabela 2

Composição bromatológica no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais.

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹					EPM ²	Valor de P ³		
	0	250	500	750	1000		Trat	Linear	Quad
	g/kg								
Matéria seca	566.7	575.8	589.0	587.3	586.5	0.194	<.0001	<.0001	0.004
Matéria orgânica	984.1	984.9	985.29	983.5	988.7	0.222	0.653	0.653	0.311
Proteína bruta	75.7	83.6	85.2	87.5	88.65	0.377	0.002	0.001	0.734
Extrato etéreo	20.0	19.8	18.7	19.7	20.05	0.012	0.468	0.271	0.397
FDN	128.64	114.44	82.24	70.02	73.78	0.255	0.025	0.085	0.023
Amido	600.36	625.44	632.6	644.5	634.6	0.071	0.004	0.169	0.003

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g).²EPM (erro padrão da média).³Probabilidade de efeito de Trat = tratamento; Linear; Quad= quadrático. FDN- Fibra em detergente neutro

Tabela 3

Perdas fermentativas em função dos tratamentos experimentais.

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹					EPM ₂	Valor de P ³		
	0	250	500	750	1000		Trat	Linear	Quad
Perdas (%)									
Gases (MN)	2.14	2.56	3.17	1.99	1.86	0.112	<.000 1	0.045	0.00 1
Efluente (MN)	6.28	7.10	7.28	3.96	2.96	0.393	<.000 1	<.000 1	0.00 1
Gases (MS)	10.5 5	9.51	8.00	7.15	6.38	0.317	<.000 1	<.000 1	0.36 4
Efluente (MS)	2.34	2.76	3.34	2.10	1.95	0.120	<.000 1	0.020	0.00 2
Total (MS)	12.9 0	12.2 7	11.3 5	9.26	8.34	0.374	<.000 1	<.000 1	0.30 8
Recuperação (MS)	87.0 9	87.7 2	88.6 4	90.7 3	91.6 5	0.374	<.000 1	<.000 1	0.30 8

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de Trat = tratamento; Linear; Quad= quadrático.

Figura 1- Diferença da temperatura do ambiente e silos experimentais de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.

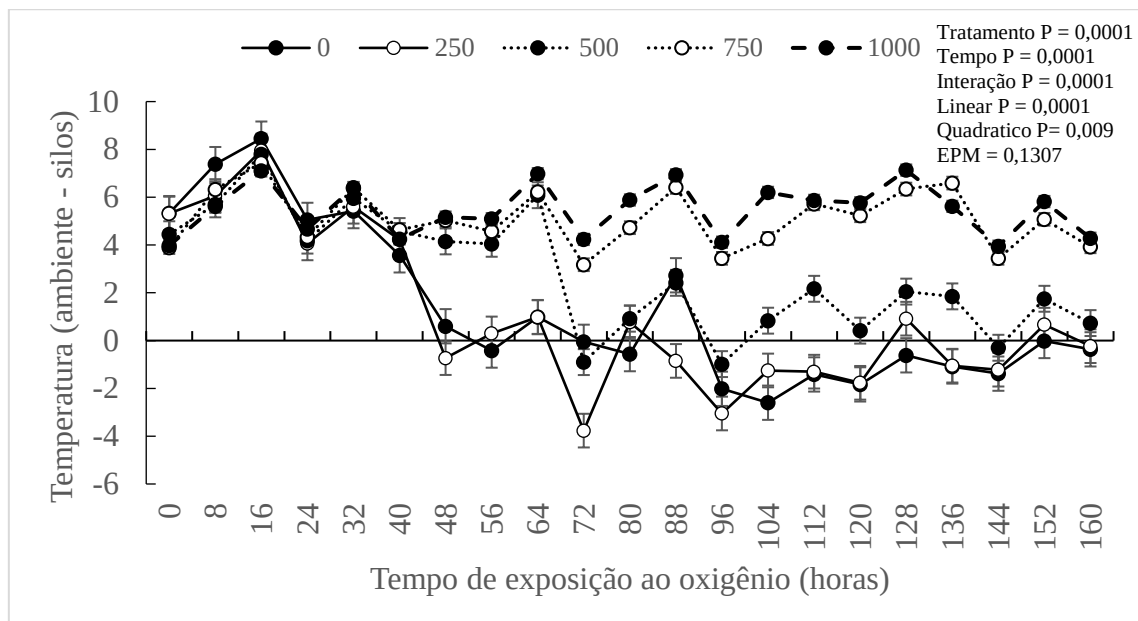


Figura 2- pH de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.

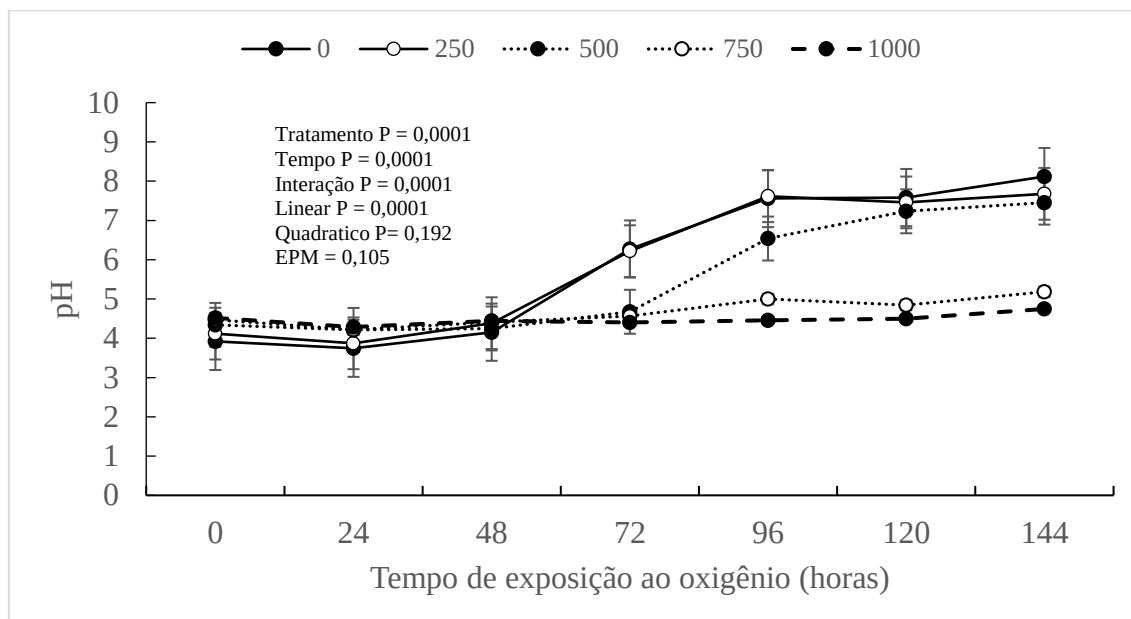


Figura 3- População de fungos e mofos de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.

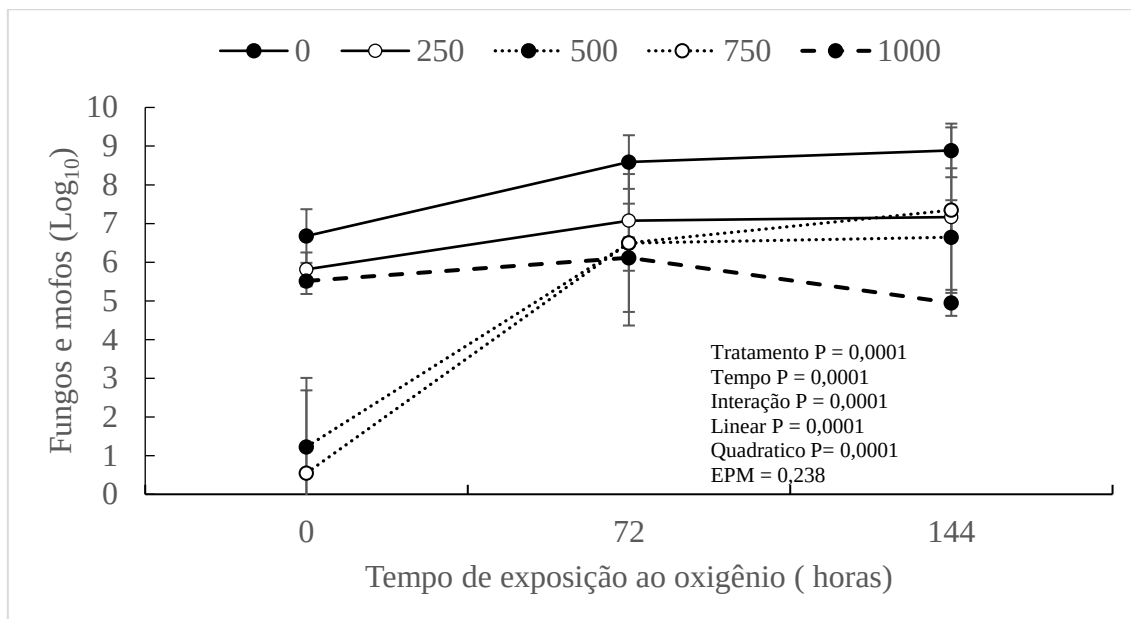


Figura 4- População de leveduras de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.

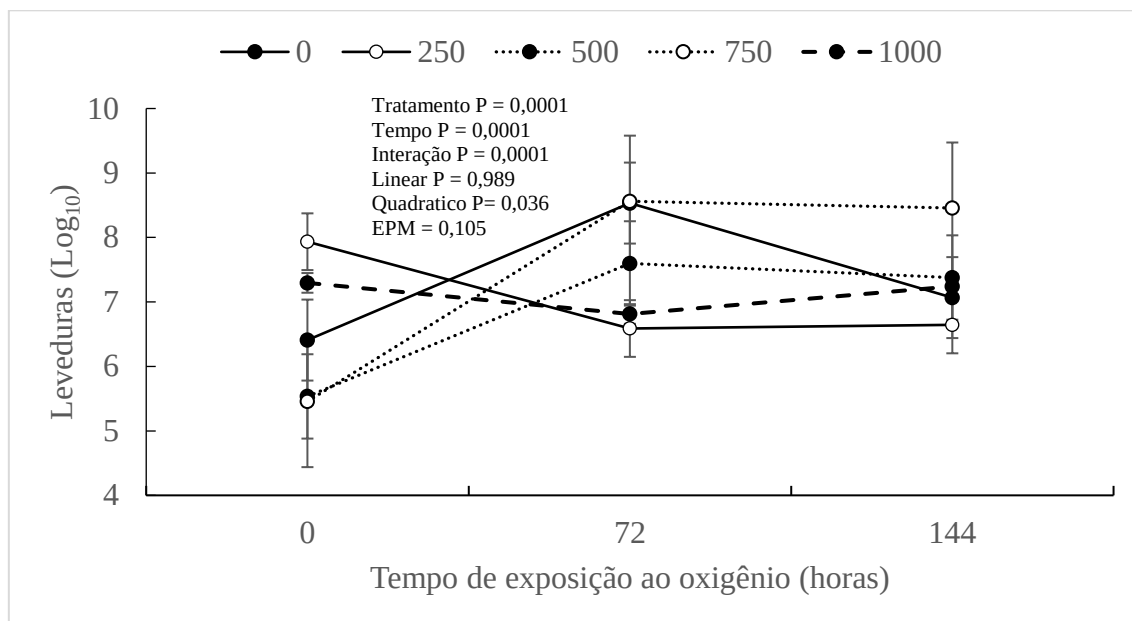


Tabela 4

Perfil microbiano e fermentativo no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹					EPM ₂	Valor de P ³		
	0	250	500	750	1000		Trat	Linear	Quad
População de microrganismo (log ₁₀)									
Bactérias ácido lácticas	5.32	7.64	6.16	5.44	5.77	0.161	<.000 1	0.003	<.000 1
Bactérias totais	5.39	8.59	7.45	8.48	7.60	0.214	<.000 1	<.000 1	<.000 1
Fungos e mofo	6.67	5.81	1.22	0.54	5.51	0.476	<.000 1	<.000 1	<.000 1
Leveduras	6.40	7.93	5.53	5.45	7.25	0.186	<.000 1	0.054	<.000 1
Perfil fermentativo									
pH	3.92	4.11	4.34	4.47	4.52	0.042	<.000 1	<.000 1	0.636
N-NH ₃ (mg/dl)	9.63	12.05	19.38	24.62	27.94	0.155	<.000 1	<.000 1	0.255
mmol/kg MS									
Etanol	4.57	3.99	3.79	4.03	5.58	0.222	0.003	0.161	0.011
Lactato	3.98	4.80	5.79	4.91	6.37	0.111	0.085	0.114	0.142
Acetato	7.13	6.50	5.59	6.20	5.59	0.377	0.694	0.232	0.634
Propionato	0.666	0.654	0.617	0.649	0.589	0.012	0.268	0.071	0.797
Butirato	1.197	1.036	1.043	1.050	0.948	0.071	0.884	0.369	0.853
Isobutirato	0.723	0.674	0.684	0.705	0.703	0.004	0.004	0.732	0.005
Valerato	0.726	0.678	0.693	0.711	0.705	0.005	0.001	0.685	0.003
Isovalerato	0.800	0.771	0.763	0.770	0.764	0.004	0.220	0.071	0.191
AGCR	2.250	2.123	2.141	2.188	2.173	0.012	0.006	0.229	0.006
Total	15.82	14.31	13.19	14.12	14.89	0.503	0.589	0.578	0.137

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de Trat = tratamento; Linear; Quad= quadrático.

Tabela 5
Degradabilidade das silagens experimentais.

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹															<i>P</i>					
	0			250			500			750			1000								
A	662	^B	±	23.3	685	^B	±	25.1	835	^A	±	20.8	902	^A	±	30.8	883	^A	±	19.4	<0.001
B	127	^A	±	27.6	109	^A	±	27.5	40.2	^{AB}	±	28.7	5.09	^B	±	33.46	14.4	^B	±	29.89	<0.001
A+B	789	^B	±	14.6	794	^B	±	11.2	875	^A	±	22.6	907	^A	±	13.1	897	^A	±	20.8	<0.001
KDB, 1/h	0.568		±	0.242	10.6		±	120.0	0.205		±	0.358	5.68		±	126.05	0.207		±	0.627	0.403
DE4%	781	^C	±	12.5	794	^C	±	10.8	869	^B	±	14.1	907	^A	±	13.0	895	^{AB}	±	14.7	<0.001
DE8%	773	^C	±	11.3	794	^C	±	9.6	864	^B	±	11.4	907	^A	±	13.0	893	^{AB}	±	12.1	<0.001
DE12%	767	^E	±	10.9	793	^D	±	7.1	860	^C	±	10.9	907	^A	±	13.0	892	^B	±	11.1	<0.001

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g).

Tabela 6

Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de acordo com as dietas experimentais.

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹					EPM ²	Valor de P ³		
	0	250	500	750	1000		Trat	Linear	Quad
<i>Consumo (kg/dia)</i>									
Matéria seca	0.871	0.958	1.01	0.957	1.00	0.051	0.922	0.500	0.664
Matéria orgânica	0.717	0.788	0.838	0.787	0.826	0.042	0.845	0.452	0.542
Proteína bruta	0.102	0.121	0.126	0.121	0.118	0.006	0.521	0.842	0.367
Extrato etéreo	0.018	0.019	0.022	0.018	0.019	0.002	0.974	0.996	0.739
FDN	0.270	0.266	0.233	0.254	0.282	0.018	0.952	0.929	0.498
Amido	0.331	0.383	0.438	0.373	0.381	0.021	0.664	0.562	0.272
<i>Consumo</i>									
% peso vivo	2.43	2.12	2.29	2.23	2.24	0.132	0.970	0.785	0.739
% peso metabólico	5.89	5.49	5.92	5.71	5.79	0.314	0.994	0.995	0.914
<i>Digestibilidade (g/kg)</i>									
Matéria seca	671.86	675.64	718.34	712.51	711.96	27.323	0.045	0.214	0.022
Matéria orgânica	721.11	725.17	770.99	764.73	764.15	29.326	0.038	0.321	0.018
Proteína bruta	723.77	768.86	816.20	779.04	777.09	19.416	0.041	0.328	0.021
Extrato etéreo	780.12	818.81	842.99	831.39	823.50	15.501	0.032	0.445	0.022
FDN	549.39	560.89	670.55	664.61	598.41	28.980	0.041	0.502	0.013
Amido	848.02	873.74	960.92	876.13	871.60	16.692	0.021	0.562	0.003

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de Trat = tratamento; Linear; Quad= quadrático.

Tabela 7

Fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais.

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹					EPM ₂	Valor de P ³		
	0	250	500	750	1000		Trat	Linea	Qua
pH	6.32	5.96	5.97	5.98	5.83	0.117	0.773	0.274	0.690
N-NH ₃ (mg/dL)	20.56	21.52	21.22	21.71	25.02	2.331	0.983	0.616	0.797
mmol/L									
Acetato	55.17	48.39	48.46	53.32	53.13	1.607	0.600	0.941	0.207
Propionato	20.27	25.18	28.31	27.23	20.81	1.813	0.001	0.214	0.002
Butirato	12.93	13.51	16.10	11.59	7.91	0.950	0.002	0.541	0.001
Isoburirato	0.878	2.00	0.611	1.24	0.819	0.167	0.085	0.123	0.542
Valerato	0.996	1.30	1.38	1.65	1.84	0.163	0.550	0.095	0.976
Isovalerato	1.54	1.13	1.21	1.74	1.82	0.220	0.652	0.541	0.561
AGCR	3.41	4.44	3.21	4.63	4.49	0.337	0.751	0.842	0.521
Total	88.68	88.92	88.82	86.41	89.97	0.914	0.554	0.874	0.652
Acetato:Propionato	2.72	1.93	1.71	1.95	2.55	0.267	0.567	0.941	0.665

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de Trat = tratamento; Linear; Quad= quadrático.

Tabela 8

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais.

Item	Níveis de protease (g/ton MN) ¹					EPM ²	Valor de P ³		
	0	250	500	750	1000		Trat	Linea r	Quad
<i>Consumo (g/dia)</i>									
Nitrogênio	16.41	19.38	20.25	19.39	18.96	1.044	0.842	0.521	0.367
<i>Excreção (g/dia)</i>									
Fezes	4.37	5.37	6.30	6.68	4.93	0.605	0.769	0.595	0.267
Urina	8.30	5.76	6.81	7.35	5.79	0.553	0.585	0.401	0.778
<i>Balanço (g/dia)</i>									
Absorvido	12.03	14.00	13.95	12.78	14.02	0.999	0.658	0.723	0.542
Retido	3.73	8.23	7.09	5.35	8.23	1.047	0.626	0.495	0.876
<i>Síntese microbiana (g/dia)</i>									
Nitrogênio	9.61	16.04	21.46	21.22	9.37	2.153	0.001	0.562	0.001
Proteína bruta	60.06	100.25	134.06	132.63	58.57	13.460	0.001	0.562	0.001

¹Inclusão de CINBENZA DP100® (extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de Trat = tratamento; Linear; Quad= quadrático.

Tabela 9

Coeficientes de regressão e pontos ótimos de inclusão de protease (CIBENZA DP100) em silagem de grão úmido de milho reidratado.

Item	Intercepto	EP	Coeficiente linear	Linear EP	Coeficiente quadrático	Quadrático EP	r ²	Ponto de máximo/mínimo (g/ton)
<i>Perdas fermentativas (%)</i>								
Gases (MN)	2.164	0.192	0.00285	0.00091044	-0.00000330	8.730413x10 ⁻⁷	0.39	432
Efluente (MN)	6.459	0.549	0.00423	0.00261	-0.00000814	0.00000250	0.59	260
Gases (MS)	10.464	0.260	-0.00428	0.00042542	-	-	0.78	
Efluente (MS)	2.371	0.203	0.00279	0.00096521	-0.00000336	9.25562x10 ⁻⁷	0.39	415
Total (MS)	13.256	0.346	-0.00486	0.00056651	-	-	0.72	
Recuperação (MS)	86.743	0.346	0.00486	0.00056651	-	-	0.72	
<i>Valor nutricional</i>								
Matéria seca	56.630	0.2092	0.00529	0.00099141	-0.00000485	9.506909x10 ⁻⁷	0.75	545
<i>Estabilidade aeróbia</i>								
Temperatura (ambiente- silos)	0.922	0.232	0.00272	0.00110	0.00000223	0.00000105	0.29	610
pH	6.117	0.168	-0.00164	0.0002758	-	-	0.14	
Fungos e mofos	7.904	0.438	-0.00821	0.00208	0.00000544	0.00000199	0.25	191
Leveduras	7.265	0.223	-0.00078586	0.00106	7.844581x10 ⁻⁷	0.00000101	0.12	500
<i>Microbiologia (Log₁₀)</i>								
Bactéria ácido láctica	5.875	0.306	0.00315	0.00145	-0.00000367	0.00000139	0.24	429
Bactérias totais	5.790	0.273	0.00855	0.00130	-0.00000682	0.00000124	0.65	626
Fungos e mofos	7.697	0.566	-0.02083	0.00268	0.00001779	0.00000257	0.70	585
Leveduras	7.087	0.377	-0.00365	0.00179	0.00000337	0.00000172	0.13	542
<i>Perfil fermentativo</i>								
pH	3.907	0.012	0.00107	0.0000598	-	-	0.98	-
N-NH ₃	18.728	0.002	3.662	0.00012	-	-	0.56	-
Etanol	4.655	0.4121	-0.00454	0.00195	0.00000536	0.00000187	0.27	236
Isobutirato	0.714	0.0079	-0.0001229	0.0000374	1.199048x10 ⁻⁷	3.58948x10 ⁻⁸	0.29	358

Valerato	0.7174	0.0083	-0.0001036	0.0000396	9.985379x10 ⁻⁸	3.799105x10 ⁻⁸	0.20	504
AGCR	2.2292	0.0237	-0.0003243	0.00011252	2.888057x10 ⁻⁷	1.078994x10 ⁻⁷	0.23	177
<i>Digestibilidade (g/kg)</i>								
Matéria seca	721.273	59.638	0.15676	0.28259	-0.00014711	0.00027098	0.28	525
Matéria orgânica	774.142	64.010	0.16825	0.30330	-0.00015790	0.00029084	0.31	522
Proteína bruta	797.194	42.202	0.07802	0.19997	-0.00003949	0.00019175	0.26	508
Extrato etéreo	818.336	34.015	0.01926	0.16118	-0.00002842	0.00015456	0.32	514
Fibra em detergente neutro	689.551	60.572	0.33483	0.28701	-0.00023103	0.00027522	0.18	502
Amido	842.963	34.364	0.28548	0.16283	-0.00026567	0.00015614	0.18	511
<i>Fermentação ruminal (mmol/L)</i>								
Propionato	22.09081	3.92552	0.01541	0.01860	-0.00001448	0.00001784	0.21	495
Butirato	11.18021	2.06574	0.00640	0.00979	-0.00000524	0.00000939	0.23	503
Síntese microbiana (g/dia)								
Nitrogênio	18.18160	4.58474	0.00024573	0.02172	-0.00000735	0.00002083	0.15	535
Proteína bruta	113.63502	28.65464	0.00154	0.13577	-0.00004594	0.00013020	0.15	535

CAPÍTULO III
INTERAÇÃO ENTRE ENZIMAS EXÓGENAS EM SILAGEM DE MILHO
REIDRATADO NA NUTRIÇÃO DE RUMINANTES

Artigo a ser submetido à revista *Animal and feed science technology*

Interação entre enzimas exógenas em silagem de milho reidratado na nutrição de ruminantes

Jamille Debora O. Batista^{*}, Jefferson R. Gandra^{**}

^{*}Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Rod. Dourados - Itahum km 12, Dourados – MS, Brasil. 79804-970.

^{**} Instituto de Estudos em Desenvolvimento Agrário e Regional, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus III, Rod. BR-230 (Transamazônica), Loteamento Cidade Jardim, Av. dos Ipês, s/n.º - Cidade Jardim, Marabá – PA, Brasil. 68500-000.

¹**Autor correspondente:** jamilledeboraob@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se avaliar a adição de protease e amilase em silagem de grão úmido de milho reidratado. Foram preparados 28 silos experimentais e distribuídos aleatoriamente em 4 tratamentos: CONTROLE (sem adição de enzimas); AMI (enzima amilolítica); PROT (enzima proteolítica); AMI + PROT (amilase + protease). O nível de protease utilizada foi de 500 g/ton e a dose de amilase utilizada foi de 300ml/ton de matéria fresca. Além das enzimas, foi adicionado o inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4×10^{10} g/UFC + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6×10^{10} g/UFC – a uma dose de 4 g/t de matéria fresca em todos os silos. Foram avaliados o valor nutricional, as perdas fermentativas, a estabilidade aeróbica, perfil microbiológico e fermentativo e a cinética ruminal em todos os silos. Já no experimento 4, 8 ovinos mestiços foram alojados em gaiolas metabólicas em delineamento em quadrado latino 4x4 contemporâneos, sendo 2 quadrados em arranjo fatorial 2x2. Durante 56 dias, os animais consumiram silagem produzida de acordo com os tratamentos do Experimento 3. Além das silagens experimentais, os animais recebiam

feno de *Cynodon ssp.* e uma mistura proteica mineral. Foram avaliados o consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes, a fermentação ruminal e o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana. Foi observado efeito no VN para a MS, FDN e o amido. Nas perdas fermentativas houve efeito para gases (MN) e (MS), efluente (MN) e (MS), perdas totais (MS) e recuperação (MS). Todas as variáveis relacionadas a estabilidade aeróbica tiveram efeito, com pH praticamente estável. A população de bactérias ácido lácticas foi superior no tratamento interação, assim como as bactérias totais. A população de mofos, fungos e leveduras, tiveram efeito para AMI e PROT. Sobre o perfil fermentativo houve resposta do pH em função da PROT e da interação, sendo maior na interação. Houve também diferença para a N-NH₃(mg/dl) em função da PROT e interação, sendo maior no tratamento PROT. Para o perfil de ácidos graxos (AG) foi possível observar diferença para lactato no tratamento PROT e na interação, com maior média de produção de lactato no tratamento PROT. Para valerato e AGtotais a resposta foi significativa para o tratamento PROT. Para a degradabilidade foi observado efeito para as frações A, A+B e DE 4%, 8% e 12%. Somente a digestibilidade da matéria seca e nutrientes apresentou significância, com a MS e a MO respondendo a PROT, o EE a AMI e o FDN e o amido a AMI+PROT. O pH teve efeito de AMI e o N-NH₃ de PROT. E para os ácidos orgânicos, foi possível verificar efeito apenas para o tratamento PROT para isobutirato, valerato, isovalerato, AGCR e AGtotais. Foi observado efeito da interação sobre a síntese microbiana (g/dia). No geral, a inclusão de amilase e protease teve impacto positivo sobre a silagem de milho reidratado, reduzindo o FDN e aumentando o amido, controlando as perdas e melhorando o perfil microbiológico, com respostas sob a degradabilidade, melhorando a digestibilidade da MS, MO, FDN e amido, e a síntese de proteína microbiana.

Palavras-chaves: α - amilase, degradabilidade, digestibilidade, protease

ABSTRACT

The objective was to evaluate the addition of protease and amylase in moist rehydrated corn grain silage. 28 experimental silos were prepared and randomly distributed into 4 treatments: CONTROL (without addition of enzymes); AMI (amylolytic enzyme); PROT (proteolytic enzyme); AMI + PROT (amylase + protease). The protease level used was 500 g/ton and the amylase dose used was 300 ml/ton of fresh matter. In addition to the enzymes, the bacterial inoculant, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brazil) – *Lactobacillus plantarum* 4×10^{10} g/CFU + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6×10^{10} g/CFU – at a dose of 4 g/CFU was added. t of fresh matter in all silos. Nutritional value, fermentative losses, aerobic stability, microbiological and fermentative profile, and ruminal kinetics were evaluated in all silos. In *experiment 4*, 8 crossbred sheep were housed in metabolic cages in a contemporary 4x4 Latin square design, with 2 squares in a 2x2 factorial arrangement. For 56 days, the animals consumed silage produced according to the treatments of *Experiment 3*. In addition to the experimental silages, the animals received hay from *Cynodon* ssp. and a mineral protein blend. Intake and digestibility of dry matter and nutrients, ruminal fermentation and nitrogen balance and microbial protein synthesis were evaluated. Effect was observed on VN for DM, NDF and starch. In the fermentative losses, there was an effect for gases (NM) and (DM), effluent (NM) and (DM), total losses (DM) and recovery (DM). All variables related to aerobic stability had an effect, with practically stable pH. The lactic acid bacteria population was higher in the interaction treatment, as well as the total bacteria. The population of molds, fungi and yeasts influenced AMI and PROT. Regarding the fermentative profile, there was a pH response as a function of PROT and the interaction, being greater in the interaction. There was also a difference for N-NH₃(mg/dl) as a function of PROT and interaction, being greater in the PROT treatment.

For the fatty acid (FA) profile, it was possible to observe a difference for lactate in the PROT treatment and in the interaction, with a higher average of lactate production in the PROT treatment. For valerate and total AG the response was significant for the PROT treatment. For degradability, an effect was observed for fractions A, A+B and DE 4%, 8% and 12%. Only the digestibility of dry matter and nutrients showed an effect. MS and the MO effect for PROT. EE AMI effect. And the NDF and the starch effect for the interaction. The pH had an AMI effect. The N-NH₃ effect of PROT. And for organic acids, it was possible to verify an effect only for the PROT treatment for isobutyrate, valerate, isovalerate, AGCR and total AG. An effect of the interaction on microbial synthesis (g/day) was observed. In general, the inclusion of amylase and protease had a positive impact on the rehydrated corn silage, reducing NDF and increasing starch, controlling losses, and improving the microbiological profile, with responses under degradability, improving the digestibility of DM, MO, NDF and starch, and microbial protein synthesis.

Keywords: α -amylase, degradability, digestibility, protease,

1. INTRODUÇÃO

A gramínea forrageira anual mais utilizada para a alimentação animal é o milho (Souza et al., 2018). O seu grão é essencialmente energético, formado por quatro principais estruturas físicas: endosperma, gérmen, pericarpo (casca) e ponta (Arcari et al., 2016) e ao longo do tempo, este alimento se tornou importante referência na produção de silagem, pela facilidade de produção, mas, principalmente, devido suas características bromatológicas quando comparada com outros tipos de silagem – com grande produtividade de matéria seca, bom valor nutritivo e boa digestibilidade (Klein et al., 2018). É a terceira cultura alimentar mais importante, depois do arroz e do trigo. O Brasil

é o terceiro produtor de milho do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e China, produzindo aproximadamente 563 das 717 milhões de toneladas/ano (Prestes et al., 2019).

Na composição de dietas de ruminantes, o milho é o alimento energético base, apresentando 90,0 g/kg de PB na MS, 610,0 g/kg amido, 190,0 g/kg de glúten, 40,0 g/kg de germe e 120,0 g/kg de água na MS (Arcari et al., 2016). Geralmente, ele é usado na forma de fubá, que é o grão de milho triturado, apresentando 874,2 g/kg de MS; 114,2 g/kg de PB; 24,9 g/kg de EE; 848,0 g/kg de CT; 730,2 g/kg de CNF; e 834,7 g/kg de NDT, conforme descrito por Andrade et al. (2014). O uso de dietas de alto concentrado vem sendo estudo como uma alternativa para melhorar o desempenho animal, a obtenção de carcaças de qualidade e a redução da idade do abate, visando aumentar o consumo de matéria seca e com isso, de todos os nutrientes e energia presentes na dieta (Bernardes, 2014; Da Costa, 2017).

O processamento é uma ferramenta que pode maximizar a utilização do amido (Souza et al., 2019). Nesse contexto, a ensilagem de grãos reidratados, por exemplo, pode aumentar a digestibilidade, através da ação das proteases bacterianas (Junges et al., 2015) que somada aos ácidos orgânicos advindos da fermentação, promovem maior solubilização das prolaminas (Hoffman et al., 2011). No entanto, grãos de cereais apresentam elevada quantidade de amido, mas baixa quantidade de carboidratos solúveis, característica que pode prejudicar o processo fermentativo, como redução na produção de ácidos orgânicos e diminuição no tempo de queda do pH (Kung Jr. et al., 2018). Assim, a utilização de aditivos enzimáticos na dieta animal pode auxiliar no processo digestivo melhorando a digestibilidade e disponibilidade dos nutrientes presentes na silagem, com o intuito de melhorar o desempenho dos nutrientes (Dilorenzo et al., 2011).

Estudos com silagem de grãos úmidos de milho constataram aumento na digestibilidade da matéria orgânica, principalmente em razão do incremento na digestão do amido no rúmen uma vez que o processamento do grão através da ensilagem promove alterações químicas e físicas nas moléculas do amido (Saylor et al., 2020; Faustino et al., 2020). Animais alimentados com dietas de alto concentrado baseados em grãos úmidos apresentam diminuição da conversão alimentar, devido a maior densidade energética, ocasionando em aumento do ganho médio diário (Ítavo et al., 2006). O processamento destes cereais aumenta a digestão do amido disponibilizando energia para o desenvolvimento microbiano e, como consequência, resultando em maior produção de ácidos graxos voláteis, conforme (Faustino et al., 2020).

Dessa forma, este estudo foi realizado para avaliar os efeitos da adição de amilase e protease sobre a silagem de milho reidratado, assim como no consumo sobre o desempenho de ovinos alimentados com as silagens experimentais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 3

Este experimento foi conduzido no período de agosto a setembro de 2019, no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II Dourados, MS. A Grande Dourados está situada na latitude 22°11'38,78260" S, longitude 54°55'49,44655" W e altitude de 478,626 metros, segundo o Sistema Geodésico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018).

Preparo da silagem

Foram utilizados nesse experimento grão de milho Biomatrix BM 3066 Pro, colhidos durante a safra 2018/2019. Após a colheita, o milho foi moído em moinhos de facas (4 mm), reidratado, na proporção de 30:100 (30 litros de água para cada 100 quilos de milho), e homogeneizado. Os silos experimentais foram feitos em tubos de polietileno de 40 cm de altura e 20 cm de diâmetro. No fundo dos silos, foi colocado areia seca (1 kg) separada da forragem por um tecido de náilon para quantificação do efluente produzido.

Vinte e oito silos experimentais foram preparados e distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos: 1- Controle (sem adição de enzimas); 2- AMI (enzima amilolítica); 3- PROT (enzima proteolítica); 4- AMI + PROT (amilase + protease). Foi adicionado o inoculante bacteriano, Kerasil Grão Úmido® (Kera Nutrição Animal, Bento Gonçalves, Brasil) – *Lactobacillus plantarum* 4×10^{10} UFC/g + *Propionibacterium acidipropionici* 2.6×10^{10} UFC/g – a uma dose de 4 g/t de matéria fresca em todos os tratamentos. O nível de protease utilizada no experimento foi de 500g/t de grão úmido (CINBENZA DP100®, extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g). A dose de amilase utilizada foi de 300 ml/ton de matéria fresca (Kerazyme 3035, atividade de amilase 300 UI/ml).

Antes do preparo dos silos experimentais, uma amostra de cada silo (porção superficial, meio e inferior) foi retida e homogeneizada 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). Os silos experimentais ficaram vedados durante 45 dias.

Valor nutricional

Os silos foram abertos após os 45 dias de fermentação e amostras compostas foram coletadas e levadas para pré-secagem em estufa de ventilação forçada a 65° C por 72h e após este período foram moídas em moinho do tipo Willey a 1 mm, e secas em estufa a 105° C para determinar a matéria seca (MS, método 950.15), cinza (método 942.05), matéria orgânica (MO, 1000-cinzas), proteína bruta (PB, N × 6.25, método Kjeldahl 984.13) extrato de etéreo (EE, método 920.39) (AOAC, 2000). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest; Robertson; Lewis (1991) e o teor de amido conforme metodologia descrita por Hendrix (1993).

Perdas fermentativas

Os silos foram pesados, para determinação das perdas por gases e, em seguida, abertos. As perdas por gases foram calculadas de acordo com a equação a seguir:

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

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

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

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

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

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

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

em que: MSf = quantidade de MS final; MSi = quantidade de MS inicial (Jobim et al., 2007).

Estabilidade aeróbia

Com a abertura dos silos, amostras foram coletadas e colocadas em baldes plásticos, pesadas e armazenadas em temperatura ambiente para avaliação da estabilidade aeróbia. A mensuração de temperatura no interior das silagens (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114 e 120 horas) foi feita com termômetro digital de infravermelho (B-Max©). Também foram registradas a temperatura ambiente e a umidade relativa do ar atrás de termo-higrômetro digital. A estabilidade aeróbia foi calculada como o tempo gasto, em horas, para a massa de forragem elevar em 1°C em relação à temperatura do ambiente (Driehuis et al., 2001). Para a determinação do pH das silagens, uma amostra de cada silo era retirada nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas, colocada em água destilada e através de um potenciômetro, mensurado (Kung JR et al., 1984). Para a MS retirava-se ±100g do material ensilado nas horas 0, 24, 48, 72, 96 e 120 que posteriormente foram colocados em estufa a 105° por 24 horas (método 950.15; AOAC, 2000). As perdas na massa ensilada foram calculadas pela diferença no conteúdo

de MS inicial e final dos silos, em relação à quantidade de MS da forragem ensilada, conforme equação descrita por Jobim et al., (2007).

Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com Silva et al. (1997), nos tempos 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. As amostras de silagem de milho reidratadas (10 g) foram diluídas em solução de cloreto de sódio esterilizada (9 g/l, 90 ml). A partir desta suspensão bacteriana, foi obtida a diluição de 10^{-2} , retirando uma alíquota de 1 ml e adicionando em um tubo de ensaio contendo 9 ml de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) e homogeneizado em vortex. O processo foi repetido até a diluição de 10^{-6} .

Cada amostra foi triplicada, e através das diluições decimais em placas de Petri foi feita a contagem de microrganismos. Para as bactérias do ácido láctico foi utilizado o método de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) no meio de cultura MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), as placas foram incubadas em estufa a 35 °C por 48 horas. Para análise de bactérias aeróbias, foi utilizado o método de plaqueamento em gotas (*drop plate*) e para as anaeróbias facultativas o método utilizado foi de plaqueamento em profundidade (*pour plate*) no meio de cultura PCA (Plate Count Ágar). As placas foram incubadas em estufa a 34 °C por 48 horas, para os microrganismos aeróbicos e a 37° C por 48 horas, para os microrganismos anaeróbicos facultativos. Para fungos totais, foi feito plaqueamento em superfície (*spread plate*) no meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), e as placas foram incubadas em estufa a 26° C por 120 horas.

Após o tempo de incubação, realizou-se a contagem dos microrganismos. Considerando apenas as placas que apresentaram contagem entre 30 e 300 unidades formadoras de colônias. Realizou-se a média aritmética. Os valores absolutos foram

obtidos a partir de UFC e depois transformados em log. Todas as análises acima citadas, foram realizadas no primeiro dia de abertura dos silos.

Perfil fermentativo

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

Cinética de degradação ruminal da matéria seca

Para avaliação da cinética ruminal, foram pesadas cinco gramas de cada amostra, após elas serem moídas (2mm), e colocadas em sacos de TNT (100g/cm²), medindo 4x5 cm, respeitando a relação 20 mg/cm². Após, colocou-se em sacolas de filó, medindo 15 x 30 cm, com seis repetições, juntamente com pesos de chumbo de 100g. As sacolas foram amarradas com fio de nylon, deixando comprimento livre de 1 metro para que elas tivessem livre movimentação nas fases sólidas e líquidas do rúmen. As amostras foram preparadas segundo as recomendações propostas por Huntington e Givens (1995) e

Nocek (1988) e então foram então depositadas na região do saco ventral do rúmen por tempo de incubação na ordem inversa (0, 3, 6, 9, 12, 24, 36 e 48 horas) para serem retirados todos ao mesmo tempo do rúmen, ao final do período, e desta forma, promover lavagem uniforme do material em água corrente até a água ter aparência translúcida.

Em seguida, os saquinhos lavados foram colocados em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas. Os sacos referentes ao tempo zero, para determinar a fração solúvel, foram introduzidos na massa ruminal e imediatamente retirados, recebendo, o mesmo tratamento destinado aos demais tempos. Os resíduos remanescentes nos sacos de TNT, recolhidos no rúmen foram analisados quanto aos teores de MS, (método 950.15) de acordo a AOAC (2000). A porcentagem de degradação foi calculada pela proporção de alimentos remanescentes nos sacos após a incubação ruminal.

Os dados obtidos foram ajustados para uma regressão não linear pelo método de Gauss-Newton (Neter et al., 1985), por meio do software SAS (SasInstitute, NC, Cary), conforme a equação proposta por (Orskov & McDonald, 1979)

Foram utilizados três animais F1 Holandês x Zebu, canulados no rúmen, com peso médio de 450 ± 30 kg, alimentados duas vezes ao dia (07:00 e as 15:00 horas) com feno de gramíneas de *Cynodon* sp. (12%), e o concentrado composto por silagem de grão reidratado (68%), uma mistura protéica mineral (20%), contendo a relação volumoso: concentrado de 12:88. Os animais passaram por um período de adaptação de 10 dias.

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:

$$Y_i = \mu + E_i + e_i \text{ onde:}$$

Y_{ijklm} = variável dependente, μ = média geral, E_i = efeito de protease ($i = 1$ a 5), e e_i = erro.

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). Os dados foram avaliados por regressão polinomial simples, adotando-se nível de significância de 5%.

Na estimativa dos parâmetros da cinética de degradação da MS, foram utilizados o modelo assintótico de primeira ordem, proposto por Orskov e McDonald (1979): $Y = a + b(1 - e^{-ct})$. Onde: Y = degradação acumulada do componente nutritivo analisado após o tempo t ; a = intercepto de curva de degradação quando $t = 0$, que corresponde à fração solúvel em água do componente nutritivo analisado; b = potencial da degradação da fração insolúvel em água do componente nutritivo analisado; $a+b$ = degradação potencial do componente nutritivo analisado quando o tempo não é fator limitante; c = taxa de degradação por ação fermentativa de b ; t = tempo de incubação. A fração considerada indegradável foi calculada da seguinte forma: $I = (100 - (a+b))$.

Depois de calculados, os coeficientes a , b e c foram aplicados à equação proposta por Orskov & McDonald (1979), para a estimativa da degradabilidade efetiva (DE), utilizando o modelo matemático: $DE = a + [(b * c) / (c + K)]$. Em que K = taxa de passagem de sólidos pelo rúmen, definida aqui como sendo de 4, 8 e 12%/h conforme sugerido pelo AFRC (1993), que pode ser atribuído ao nível de consumo alimentar baixo, médio e alto. Após os dados serem ajustados ao modelo e utilizando o valor de desaparecimento obtido no tempo zero (" a "), foi estimado o tempo de colonização (TC)

para a MS, PB e FDN, da mesma forma que Goes et al. (2010), em que os parâmetros “a”, “b”, e “c” foram estimados pelo algoritmo de Gaus Newton: $TC = [-\ln(a'-a-b)/c]$.

Experimento 4

Este experimento foi conduzido no período de setembro a novembro de 2019, no setor de Nutrição de Ruminantes e Forragens Conservadas pertencente à Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) da Universidade Federal da Grande Dourados, Unidade II Dourados, MS. A Grande Dourados está situada na latitude 22°11'38,78260" S, longitude 54°55'49,44655" W e altitude de 478,626 metros, segundo o Sistema Geodésico do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018).

Animais, instalações e dietas

Oito ovinos mestiços foram distribuídos em delineamento DQL 4x4 contemporâneos, sendo 2 quadrados em arranjo fatorial 2x2. A dieta fornecida foi formulada com ganho médio diário de 200 g, utilizando o Small Ruminants Nutritional System (SRNS) e continha a relação volumoso:concentrado de 37:63. O volumoso fornecido foi feno *Cynodon spp.* (37%), e o concentrado composto por silagem de grão reidratado (38%) e uma mistura proteica mineral (25%). Essa mistura, constituída de grão de soja moído (88%) e mistura mineral (12%).

Os oito ovinos dentro de cada quadrado foram distribuídos aleatoriamente de acordo com as seguintes dietas experimentais: 1- Controle; 2-PROT (inclusão de 500g g/ton de CIBENZA DP100), 3- AMY (inclusão de 300 g/ton de amiloglucosidase), 4- PROT+AMY (inclusão de 300 g/ton amiloglucosidase + 500 g/ton de CIBENZA DP100®, extrato enzimático de *Bacillus licheniformis*, atividade de protease 600 UI/g).

O período experimental total foi de 56 dias, onde, em cada período, 10 dias eram para adaptação dos animais e 4 dias para colheita de dados. Os animais alojados em

gaiolas metabólicas, eram alimentados duas vezes ao dia, as 07:00 e as 13:00 horas. Amostras de alimentos e sobras foram coletadas diariamente durante o período de amostragem e reunidas em uma amostra composta para análises químico-bromatológicas subsequentes (Tabela 1).

Consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes

Diariamente foram feitas pesagens da quantidade de alimentos, concentrado e das sobras de cada tratamento com a finalidade de estimativa do consumo. Para a avaliação do consumo, as sobras da dieta foram pesadas diariamente sendo ajustado o fornecimento para um consumo *ad libitum* com sobras calculadas em 10 a 15%.

Para o consumo de matéria seca e nutrientes as dietas e sobras foram pesadas todos os dias e realizadas análises de MS (método 950.15), cinza (método 942.05), MO (MM-cinzas), PB ($N \times 6.25$, método 984.13) e EE (método 920.39) (AOAC, 2000). O FDN (sem sulfito de sódio), foi determinado de acordo com Van Soest; Robertson; Lewis, (1991) e o amido conforme o método de Hendrix (1993).

Para a digestibilidade da matéria seca e nutrientes foram realizadas coleta total de fezes por 72 horas. As amostras obtidas foram homogeneizadas para compor uma amostra composta de cada animal em cada período experimental. As amostras compostas foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm. Posteriormente foram realizadas análises de nutrientes idênticas ao consumo.

Fermentação ruminal

No 14º dia de cada período experimental, 4 horas após alimentação foi coletado líquido ruminal através de sonda esofágica de acordo com Ortolani (1981).

Imediatamente após a coleta, o pH foi mensurado através de potenciômetro digital (MB-10, Marte, Santa Rita do Sapucaí, Brasil) (Silva & Queiroz, 2002).

As amostras seguiram para serem centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos. Ao final, 2 ml do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,4 ml de ácido fórmico P.A., arrolhado, identificado e armazenado a -20°C para determinação de AGCC. A metodologia utilizada para análise de AGCC foi a preconizada por Erwin et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gás Chromatograph, Marca Finnigan) onde foram colocadas 1µL de amostra e o cromatógrafo integrado a um computador, processava os cálculos de quantificação a partir do software GC solution Shimadzu.

A amônia-N foi determinada pelo método colorimétrico de fenol-hipoclorito (Broderick; Kang, 1980).

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Para o balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana foi realizada coleta total de urina por 48 horas entre os dias 12 e 13 de cada período experimental. Ao longo das 48 horas, foram coletadas amostras spot durante a micção espontânea, às 11h00, ou seja, quatro horas após o fornecimento da refeição às 07h00. Uma alíquota de 10 ml da urina foi diluída em 40 ml de ácido sulfúrico 0,036 N. Nesse processo, o pH foi ajustado, se necessário, para valores abaixo de 3, com gotículas de concentrado ácido sulfúrico, visando prevenir a destruição bacteriana dos derivados de purina e precipitação do ácido úrico. As amostras foram armazenadas a -18 °C para análises posteriores os derivados da purina alantoína, ácido úrico, xantina e hipoxantina.

As análises desses derivados foram realizadas conforme a técnica descrita por Chen; Gomes (1992). Purinas microbianas absorvidas (X, mmol dia⁻¹) foram calculados

a partir da excreção de derivados de purina (Y, mmol dia⁻¹), pela seguinte equação: $Y = 0,84X + (0,150 BW^{0,75} - 0,25X)$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados da purina urinária e $0,150 BW^{0,75}$ e $-0,25X$ é a contribuição endógena à excreção de purinas (Verbic et al., 1990). O fluxo intestinal dos compostos nitrogenados (Y, g N dia⁻¹) foi calculado em função das purinas microbianas absorvidas (X, mmol dia⁻¹), usando a seguinte equação: $Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$, em que 70 é o teor de N nas purinas (mg/N mmol); 0,83 é a digestibilidade das microbianas purinas; e 0,116 é a Purina N: bacteriana N. A produção microbiana foi expressa como g N microbiano (gramas de N microbiano) e P microbiano (gramas de proteína microbiana).

Para o balanço de nitrogênio foi calculado o consumo, excreção de nitrogênio da urina e fezes ($N \times 6.25$, método 984.13), (AOAC, 2000). O cálculo foi realizado de acordo com as seguintes fórmulas:

$$N_{\text{absorvido}} = N_{\text{consumido}} - (N_{\text{fezes}})$$

$$N_{\text{retido}} = N_{\text{consumido}} - (N_{\text{fezes}} + N_{\text{urina}})$$

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:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + A_j + P_j(A_j) + e_{ijklm} \text{ onde:}$$

Y_{ijklm} = variável dependente, μ = média geral, A_j = efeito de amilase ($A_i = 1$ a 2), P_j = efeito de protease ($l = 1$ a 2), $Pl(A_m)$ = efeito de interação e e_{ijklm} = erro.

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). Os dados foram avaliados adotando-se nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

Valor nutricional

Foi observado efeito significativo ($P \leq 0,05$; Tabela 2) da composição bromatológica dos silos no momento da abertura em função dos tempos experimentais para a MS em função da alfa-amilase e para interação amilase*protease, para o FDN em função da alfa-amilase e para o amido. A MS o tratamento controle foi superior aos demais tratamentos, com o tratamento PROT não tendo diferido dos demais. Já para o amido, a menor média foi do tratamento AMI

Perdas fermentativas

Com relação as perdas fermentativas em função dos tratamentos experimentais, pode ser observado na Tabela 3, que houve efeito significativo ($P \leq 0,05$) para gases (MN) em função da AMI e PROT, para efluente (MN) em função da AMI, PROT e interação amilase*protease, com o controle sendo inferior aos demais tratamentos. Houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) para gases (MS) em função da AMI, PROT e interação amilase*protease, com o controle sendo superior aos demais tratamentos. Houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) para perdas fermentativas por efluentes (MS) em função da AMI e PROT. Houve efeito ($P \leq 0,05$) sobre as perdas totais (MS), com as maiores médias para os tratamentos AMI e interação amilase*protease, assim como também sobre a recuperação (MS), com a maior média no tratamento PROT.

Estabilidade aeróbia

Com relação a diferença da temperatura do ambiente e silos experimentais de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio (Figura 1), foi possível observar diferença significativa ($P \leq 0,05$) para todas as variáveis. A temperatura se manteve instável ao longo da mensuração, contudo foi possível observar uma redução da temperatura ambiente dos silos após 96 hora de exposição ao oxigênio, com exceção do tratamento interação amilase* protease.

Com relação ao pH de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio (Figura 2) somente não foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) a variável tempo. Com o pH mantendo-se praticamente estável para os tratamentos AMI, PROT e interação amilase*protease até as 72h aumentando para o tratamento PROT após esse período.

Em relação a população de fungos e mofos de acordo com tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio (Figura 3), foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) para todas as variáveis. Onde a população de fungos e mofos aumentou até as 72h de exposição ao oxigênio em todos os tratamentos, e nos tratamentos amilase e protease o crescimento continuou até as 144 horas de exposição.

Com relação a população de leveduras de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio (Figura 4), foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) para todos os tratamentos. Onde a população de leveduras aumentou até as 72h de exposição ao oxigênio em todos os tratamentos com ênfase para o tratamento PROT, que o aumento foi mais significativo. Após as 72h a população de leveduras quase que estabilizou para os tratamentos PROT e controle, tendo aumentado nos tratamentos AMI e interação amilase*protease.

Perfil microbiano e fermentativo

Com relação ao perfil microbiano e fermentativo no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais (Tabela 4), foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) para a população bactérias ácido lácticas, para AMI, PROT e interação amilase*protease, que foi superior estatisticamente no tratamento interação amilase*protease. As bactérias totais, tiveram efeito da interação amilase*protease, com média superior no tratamento interação amilase*protease. A população de mofos e fungos assim com as leveduras, tiveram efeito para o tratamento AMI e PROT. Com relação ao perfil fermentativo houve diferença estatística ($P \leq 0,05$) do pH em função da PROT e interação amilase*protease, com o pH sendo mais alto no tratamento amilase*protease. Houve também diferença estatística ($P \leq 0,05$) para a $N-NH_3$ (mg/dl) em função da PROT e interação amilase*protease. Com o $N-NH_3$ (mg/dl) sendo maior no tratamento PROT. Com relação ao perfil de ácidos graxos (AG) em mmol/kg MS foi possível observar diferença estatística ($P \leq 0,05$) para lactato no tratamento PROT e interação amilase*protease, com maior média de produção de lactato no tratamento AMI. Para valerato e AGtotais a resposta foi significativa para o tratamento PROT.

Cinética ruminal de degradação ruminal da matéria seca

Com relação a degradabilidade das silagens experimentais (Tabela 5), foi observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) para as frações: A no tratamento protease; A+B nos tratamentos alfa-amilase e protease e degradabilidade efetiva (DE) a 4%, 8% e 12%/h, nos tratamentos alfa-amilase e protease.

Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes

O consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de acordo com as dietas experimentais (Tabela 6) não apresentaram resultado significativo ($P \leq 0,05$) para o

consumo, mas teve efeito sobre a digestibilidade. A MS e a MO tiveram efeito para o tratamento PROT. O EE teve efeito de AMI. Já o FDN e o amido apresentaram efeito para a interação amilase*protease.

Fermentação ruminal

Os resultados a respeito da fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais estão apresentadas na Tabela 7. O pH demonstrou significância ($P \leq 0,05$) para o tratamento AMI. O N-NH₃ foi significativo para PROT. E para os ácidos orgânicos, foi possível verificar efeito apenas para o tratamento PROT para isobutirato, valerato, isovalerato, AGCR e AGtotais.

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Com relação ao balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais (Tabela 8) foi observado efeito significativo ($P \leq 0,05$) apenas para a síntese microbiana (g/dia), com efeito de interação amilase*protease, onde se confirmou as maiores médias.

4. DISCUSSÃO

Valor nutricional

Gandra et al. (2021) encontraram maior teor de matéria seca no tratamento CON ao comparar uma enzima amilolítica (GLU) com uma outra celulolítica (CEL), mas não houve diferença entre os tipos enzimáticos. A celulase (CEL) provavelmente apresentou menor teor de MS devido às maiores perdas de efluentes, mas isso não foi observado para glucoamilase (GLU). Lynch et al. (2015) ao adicionar celulase e xilanase à forragem de milho antes da ensilagem, observaram redução na recuperação da MS. Ainda Gandra et al. (2021) observaram que na silagem de milho tratada com enzima celulolítica houve

aumento no teor de amido e da proteína bruta, com redução da FDA. Neste trabalho, o teor de amido foi menor e o FDN foi maior no tratamento AMI.

Perdas fermentativas

As menores médias de recuperação de MS nas silagens contendo AMI pode ser reflexo da maior perda por gases nesse material. A amilase, ao solubilizar o amido, fornece um maior aporte de substrato favorecendo o crescimento de bactérias do ácido-láticas (BAL), aumentando a extensão da fermentação. Durante a fermentação dos açúcares solúveis, ocorre tanto a formação de ácidos orgânico, como também de CO₂, produzidos por leveduras que foram encontradas em maior quantidade nas silagens acrescidas de enzimas amilolíticas, gerando maiores perdas de MS (Borreani et al., 2018).

Jesus et al. (2019) e Grizotto et al. (2020) também defendem essa mesma ideia. Para esses autores, a maior produção de perda por gases nas silagens contendo enzimas é favorecida por fermentações secundárias, realizadas por microrganismos indesejáveis a exemplo dos *Clostridium*, leveduras e enterobactérias. Esses grupos de microrganismos crescem em pH próximo a 4, valor encontrado nesse estudo para todos os tratamentos dentro das primeiras 24 horas. Juntando a esse fato a maior disponibilidade de carboidratos fermentáveis pela ação das enzimas, especialmente AMI, que degrada o amido em moléculas menores (maltose, glucose, dissacarídeos), temos como resultado o aumento das perdas por gás e redução da recuperação (MS).

Mota et al. (2015) avaliaram o efeito de aditivos na ensilagem de capim-elefante em relação às suas perdas e características fermentativa, e observaram que não houve efeito significativo para perdas por efluentes, mas quanto aos níveis de inclusão o autor observou que no maior nível de inclusão (10%) aconteceu maior perda (11,50 kg/t/MV). O aumento da perda por gases na matéria natural e de efluentes na matéria natural e na matéria seca com redução na recuperação da matéria seca pode indicar que a matriz

amido-proteína próxima aos grânulos de amido evita a fixação microbiana e a digestão enzimática (Giuberti et al., 2014).

Estabilidade aeróbica

Quando a silagem é exposta ao ar durante o armazenamento (por qualquer motivo) ou na alimentação, o lactato utilizando leveduras pode iniciar a deterioração aeróbia (Kung, 2018). As silagens que são aerobicamente estáveis são desejáveis porque o ar frequentemente penetra na massa de silagem durante o armazenamento e durante a alimentação, podendo penetrar mais de 1 m na superfície de alimentação (Kung, 2018).

Neste caso, foi possível observar que a dição da protease ajudou a manter a temperatura das silagens após a exposição ao oxigênio em todos os tratamentos, e a manter o pH em torno de 4,0 nos tratamentos protease e interação amilase*protease.

A grande maioria dos estudos com enzimas faz uso de celulasas e hemicelulasas para melhorar a liberação de carboidratos da parede celular vegetal, e assim, aumentar a disponibilidade de substrato para que BAL possam produzir ácido lático (Muck et al., 2018). Mas, é importante lembrar que existe um limite ótimo para o crescimento desses microrganismos, uma vez que quando em excesso no material o ácido lático pode ser assimilado por leveduras e iniciar a deterioração em muitos tipos de silagens (Woolford, 1990). Danner et al. (2003) destacaram a concentração de ácido acético como o principal ácido orgânico positivamente associado a menores valores de pH da silagem após exposição aeróbia, e outro ácido importante é o propiônico, que tem sido associado ao efeito antimicótico após exposição aeróbia (Kung et al., 1998), e que nesse estudo em questão não sofreram efeitos da adição de enzimas.

Perfil microbiano e fermentativo

O ácido acético é o principal ácido orgânico associado positivamente à estabilidade aeróbia da silagem (Danner et al., 2003). Já o ácido lático, que pode ser assimilado por leveduras, pode iniciar a deterioração em muitos tipos de silagens (Woolford, 1990). Mas, a deterioração em silagens está mais associada à umidade do material do que à concentração de ácido acético (Rezende et al., 2014). Assim, um maior teor de MS aumenta a osmolaridade e diminui a atividade de água, inibindo assim o crescimento de leveduras e bolores (Pahlow et al., 2003). No geral, mesmo com a redução do teor de MS da silagem, observou-se efeitos positivos na estabilidade aeróbia.

A inclusão da amilase favorece o aumento da população microbiana, e deixa o substrato mais acessível (Junges et al., 2017), e a protease passa a ter um papel mais limitante quanto ao tipo de população que será favorecida, já que ela confere uma melhor estabilidade ao silo.

Cinética Cinética ruminal de degradação ruminal da matéria seca

Alimentos com maior fração solúvel (A) facilitam a fermentação pelos microrganismos no rúmen, pela rápida disponibilidade de nutrientes. Esse aspecto, até certo ponto, é interessante, já que o aumento no crescimento e multiplicação microbiana pode diminuir o tempo de colonização do alimento. Aliado a isso, o arranjo da matriz proteica no grão pode facilitar a ação das enzimas bacterianas (Silva et al., 2018).

Híbridos de endospermas com alta vitreosidade apresentam acentuada redução na degradabilidade (Faustino, 2020). A baixa DE pode ser atribuída à presença de uma matriz mais rígida ao redor do grânulo de amido. Quanto mais densa a matriz, mais difícil a adesão do biofilme bacteriano ao substrato, comprometendo também a extensão da degradação da fração lentamente degradável (B) (Silva et al., 2018). Dessa forma, a

quando a porção solúvel (A) apresenta elevada taxa de desaparecimento a fração lentamente degradável (B) é reduzida (Jobim et al., 2011).

Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes

Cordeiros alimentados com silagens contendo enzimas apresentaram maior consumo de MS, PB e amido, e digestibilidade total do trato. Os efeitos positivos das enzimas sobre a digestibilidade do amido e da MS eram de certa forma esperados, conforme observado em ensaio *in vitro*. Assim, a melhora na taxa de degradação da ração e no escoamento ruminal determinam o aumento do consumo de ração. Além disso, a maior degradação da proteína durante a fermentação da silagem tem sido associada ao aumento da concentração de ácido lático nas silagens de milho reidratado (Ferraretto et al., 2018).

As enzimas melhoraram a solubilização do amido (Oliveira et al. 2019), e nesse estudo foi observado um efeito positivo na digestibilidade do amido com ação da interação amilase*protease.

Fermentação ruminal

Muck et al., (2013) revelaram ter observado melhorias no desempenho animal em aproximadamente metade dos estudos pesquisados, onde inoculantes melhoraram o ganho de peso em gado em crescimento e em vacas em lactação. Onde a silagem inoculada produziu um efeito positivo, com média de aumento no ganho diário de 5% e 3% na produção de leite. As causas para esses aumentos no desempenho são difíceis de explicar. A ingestão da silagem foi melhorada em apenas um quarto dos ensaios, o desempenho parece estar mais relacionado com a eficiência da utilização da silagem pelo gado, em vez da quantidade de silagem consumida.

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana

Na ensilagem do grão úmido, o maior teor de umidade do grão favoreceu a fermentação no interior do silo, resultando em maior solubilização dos nutrientes e em aumento da suscetibilidade do amido à hidrólise enzimática, causando melhora na eficiência alimentar dos animais e na síntese de proteína microbiana, a qual aumentou linearmente com o uso de grãos úmidos em relação a grãos secos triturados, segundo Saylor et al. (2020). O aumento da produção microbiana contribuiu muito com a qualidade da proteína que chega ao duodeno, pois o perfil de aminoácidos essenciais das bactérias, principalmente lisina e metionina, é preponderante para a máxima produção de leite e crescimento do animal.

5. CONCLUSÃO

A inclusão de amilase e protease à silagem de grão úmido reidratado, reduziu o FDN e aumentou o teor de amido, reduziu as perdas totais e melhorou o perfil microbiológico, melhorou os aspectos de degradabilidade das silagens com reflexos na digestibilidade da MS, MO, FDN e amido e também sobre síntese de proteína microbiana.

6. REFERÊNCIAS

- Agricultural And Food Research Council – AFRC. 1993. Energy and protein requirements of ruminants. Wallingford: CAB International, 159p.
- AOAC, 2000. Association of official agricultural chemists. Official Method of Analysis. (17th ed).
- Arcari, M. A.; Martins, C. M. M. R.; Tomazi, T.; Gonc, J. L.; Santos, M. V. 2016. Effect of substituting dry corn with rehydrated ensiled corn on dairy cow milk yield and nutrient digestibility. *Animal Feed Science and Technology* 221: 167–173.

- Beauchemin, K. A., Rode, L. M., Meakawa, M., Morgavi, D., Kampen, R. 2000. Evaluation of a non-starch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. *Journal of Dairy Science*, 83: 543-553.
- Borreani, G.; Tabacco, E.; Schmidt, R. J.; Holmes, B. J.; Muck, R. E. Silage review: Factors affecting dry matter and quality losses in silages. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 5, p. 3952-3979, 2018.
- Broderick, G. A., Kang, J. H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63(1): 64-75.
- Chen X. B., Gomes, M. J. 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. *Rowett Research Institute*, 1(1): 1-21.
- Correa, C.E.S. et al. 2002. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, 85(11): 3008-3012.
- Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., Braun, R. 2003. Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1): 562-567.
- Dilorenzo, N., Smith, D. R., Quinn, M. J., May, M. L., Ponce, C. H., Steinberg, W., Engstrom, M. A., Galyean, M. L. 2011. Effects of grain processing and supplementation with exogenous amylase on nutrient digestibility in feedlot diets. *Livestock Science*, 137(1): 178-184.
- Ding, M.I., Koizumi, H., Suzuki, Y. 1995. Comparison of three chromatographic systems determination of organic acids in wine. *Analytical Sciences*, 11: 239–243.
- Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Van Wikselaar, P.G. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus*

- buchneri with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56(4): 330-343,
- Erwin, E.S., Marco, G.J., Emery, E.M. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, 44(9): 1768-1771.
- Faustino, T. F., Dias e Silva, N. C., Leite, R. F. 2020. Utilização de grão de milho reidratado e casca de café na alimentação animal. *Revista Científica Rural*, 22(1): 259-275, Doi: <https://doi.org/10.30945/rcr-v22i1.371>
- Ferraretto, L.F., Crump, P.M., Shaver, R.D. 2013. 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*, 96(1): 533–550. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9891>
- Ferraretto, L. F., Silva Filho, W. I., Fernandes, T., Kim, D. H., Sultana, H. 2018. Effect of ensiling time on fermentation profile and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated corn with or without varied concentrations of wet brewers grains. *Journal of Dairy Science*, 101(5): 4643–4649, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14329>
- Foldager, J. 1977. Protein requirement and non protein nitrogen for high producing cow in early lactation. Ph.D. thesis, East Lasing - Michigan State University.
- Franzoni, A. P. S. 2012. Efeito do processamento do milho no desenvolvimento do rúmen, desempenho de bezerros e digestibilidade in vitro do grão. 2012. 138p. Dissertação (Mestrado) -Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- Gandra, J. R. Nunes, A. T., Oliveira, E. R., Silva, M. S. J., Pedrini, C. A., Machado, F. S., Silva, G. K. R., Gandra, E. R. S., Mendes, P. V. C., Pause, A. G. S. 2021. Effect of Amylolytic and Cellulolytic Enzymes on Whole Plant Corn Silage: Characteristics of Silage and Animal Digestion, 08 June 2021, PREPRINT (Version 1) available at Research Square. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-569714/v1>

- Giuberti, G., Gallo, A., Masoero, F.Y, Ferraretto, L. F., Hoffman, P. C., Shaver, R. D. 2014. Factors affecting starch utilization in large animal food production system: A review. *Starch-Stärke*, 66(1-2): 72-90.
- Gomes, M. S., Pinho, R.G.V., Oliveira, J. S., Ramalho, M. A. P., Viana, A. C. 2002. Adaptabilidade e estabilidade de cultivares de milho para produtividade de matéria seca e degradabilidade ruminal de silagem. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, Sete Lagoas, 1(2): 83-90.
- Grizotto, R. K.; Siqueira, G. R.; Campos, A. F.; Modesto, R. T.; Resende, F. D. D. Fermentative parameters and aerobic stability of orange peel silage with pelleted citrus pulp. 2020. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 49 (1):11-17.
- Goes, R. H. T. B.; Souza, K.A.; Patussi, R.A.; Cornelio, T.C.; Oliveira, E.R.; Brabes, K. C. S. 2010. Degradabilidade in situ dos grãos de crambe, girassol e soja, e de seus coprodutos em ovinos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 32 (3): 271-277.
- Hendrix, D.L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. 1993. *Crop Science*, 33:1306-1311.
- Hibberd, C.A. et al. 1985. Effect of sorghum grain variety and reconstitution on site and extent of starch and protein digestion in steers. *Journal of Animal Science*, Savoy, 61 pp.702.
- Hoffman, P. C.; Esser, N. M.; Shaver, R.D.; Coblenz, W.K.; Scott, M. P.; Bodnar, A.L.; Schmidt, R.J.; Charley, R. C. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *Journal of dairy science*, 94(5): 2465–2474.
- Holden, L.A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science*, Champaign, 82(8): 1791-1794.

- Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75:852–867.
- Huntington, J.A.; Givens, D.I. 1995. The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. *Nutrition Abstracts and Review (Serie B)*, 65 (2): 63-93.
- Ítavo, C. C. B. F., Moraes, M. D. G., Ítavo, L. C. V., Souza, A. R. D. L. D., Oshiro, M. M., Biberg, F. A., ... Lempp, B. 2006. Efeitos de diferentes fontes de concentrado sobre o consumo e a produção de cordeiros na fase de terminação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, :139-146.
- Jesus, D. L. S. D.; Rigueira, J. P. S.; Monção, F. P.; Alves, W. S.; Moura, M. M. A.; Sales, E. C. J. D.; Rocha Júnior, V. R. Nutritive value of sugarcane silages added with increasing levels of acetic acid. 2019. *Semina Ciências agrárias*. 40(5,supl.1): 2387-2396.
- Jobim, C. C., Ferreira, G. A., Junior, V. H. B., Junior, M. C., Santos, G. T. 2011. Cinética de degradação ruminal dos fenos de alfafa e Tifton-85 e da silagem de milho. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, 32(2): 747-758.
- Junges, D., Moraes, G., Spoto, M. H. F., Santos, P. S., Adesogan, A. T., Nussio, L. G., Daniel, J. L. P. 2017. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. *Journal of Dairy Science*, v. 100, (11): 9048–9051.
- Junges, D., Moraes G., Daniel, J.L.P., Spoto, M.H.F., Nussio, L.G. 2015. Contribution of proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages. In: XVII International Silage Conference, Anais... Piracicaba: p. 566-567.

- Klein, J. L., Viana, A. F. P., Martini, P. M.; Adams, S. M., Guzzatto, C.; Bona, R. D. A., ... & Brondani, I. L. 2018. Desempenho produtivo de híbridos de milho para a produção de silagem da planta inteira. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, v. 17, n.1, p. 101-110.
- Kulasek, G. 1972. A micromethod for determination of urea in plasma, whole blood and blood cells using urease and phenol reagent. *Polskie Archiwum Weterynaryjne*, 15(4): 801-810.
- Kung Jr, L. 2018. Silage fermentation and additive. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 26(3-4).
- Kung Jr, L., Grieve, D. B., Thomas, J. W., Huber, J. T. 1984. Added Ammonia or Microbial Inocula for Fermentation and Nitrogenous Compounds of Alfalfa Ensiled at Various Percents of Dry Matter. *Journal of Dairy Science*, v. 67, n. 2, p. 299–306,
- Lynch JP, O’Kiely P, Waters SM, Doyle EM. 2012. Conservation characteristics of corn ears and stover ensiled with the addition of *Lactobacillus plantarum* MTD-1, *Lactobacillus plantarum* 30114, or *Lactobacillus buchneri* 11A44. *J Dairy Sci.* 95(4):2070–2080.
- Martins, A. S., Zeoula, L. M., Prado, I. N., Martins, E. N., Loyola, V. R. 1999. Degradabilidade Ruminal In Situ da Matéria Seca e Proteína Bruta das Silagens de Milho e Sorgo e de Alguns Alimentos Concentrados. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28(5): 1109-1117.
- Mendes, I. A. P. 2013. Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagem de grão de milho moído reidratado substituindo milho seco moído do concentrado. 54p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426–428.

- Mota, P. E. S., Moura, R. L., Portela, G. L. F., Carvalho, W. F., Oliveira, M. R. A. 2015. Perdas e características fermentativas da silagem de capim elefante com diferentes aditivos. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 11(1): 126 - 130.
- Muck, R., Weinberg, Z. G., Contreras-Govea, F. E. 2013. Silage extracts used to study the mode of action of silage inoculants in ruminants. *Agricultural and Food Science*, 22(1), 108-114. DOI: <https://doi.org/10.23986/afsci.6717>.
- Neter, J., Wasswram, W., Kutner, M. H. *Applied linear statistical models: Regression. Analysis of Variance, and Experimental Designs*, 2nd Edition, Homewood: Richard D, 1985.
- Ngonyamo-Majee, D.; Shavera, R.D.; Coors, J.G.; Sapienza, D.; Lauerbet, J.G. 2008. Relationships between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn germplasm: II. Ruminal and post-ruminal degradabilities. *Animal Feed Science and Technology*, 142: 259-274. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.09.001>.
- 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., Da Silva, M. S. J., Gandra, E. R. S., Pereira, T. L., Gandra, J. R. (2019). Effects of exogenous amylolytic enzymes on silage fermentation, nutritive value, and digestibility of rehydrated corn. *Animal Feed Science and Technology*. doi:10.1016/j.anifeedsci.2019.03.
- Orskov, E.R.; McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92(1): 499-503.
- Ortolani, E. L. 1981. Considerações técnicas sobre o uso da sonda esofágica na colheita do suco de rúmen de bovinos para mensuração do pH. *Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais*, v. 33, n. 2, p. 269-275,

- Owens, F.N., Soderlund, S. Ruminant and post ruminant starch digestions by cattle. In: Cattle Grain Processing Symposium, 2006, Tulsa. Proceedings... Tulsa: Oklahoma State University, 2006. p. 116-128.
- Owens, F.N. et al. 1997. The effect of grain source and grain processing on performance of feedlot cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 75: 868-79.
- Pahlow, G. et al. 2003. Microbiology of Ensiling. In: Dwayne R. Buxton., Richard E. Muck., Joseph H. Harrison. (Ed.). *Silage science and technology*. Madison, Wisconsin - USA: American Society of Agronomy, Inc.; Crop Science Society of America, Inc.; Soil Science Society of America, Inc., pp. 31-93. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr42.c2>.
- Pereira, M. N., Von Pinho, R. G., Bruno, R. G. S., 2004. Caestine, G. A. Ruminant degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. *Scientia Agricola*, 61(4): 358-363.
- Rezende, A. V., Rabelo, C. H. S., Veiga, R. M., Andrade, L. P., Härterb, C. J., Rabelo, F. H. S., Basso, F. C., Nogueira, D. A., Reis, R. A. 2014. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. *Animal Feed Science and Technology*. 197(213-221). <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.009>.
- Rodrigues, P. H. M. et al. 2012. Effects of microbial inoculants and amino acid production by-product on fermentation and chemical composition of sugarcane silage. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 41(6): 1394-1400. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000600011>.
- Saylor, B. A., Casale, F., Sultana, H., Ferraretto, L. F. 2020. Effect of microbial inoculation and particle size on fermentation profile, aerobic stability, and ruminant in situ starch degradation of high-moisture corn ensiled for a short period. *Journal of Dairy Science*, 103(1). <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16831>.

- Silva, N., Junqueira, V.C.A., Silveira, N.F.A. 1997. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, pp. 295.
- Silva, D.J., Queiroz, A.C. 2002. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. 3ed. Viçosa Universidade Federal de Viçosa, pp. 235.
- Silva, N. C., Nascimento, C. F., Nascimento, F. A., De Resende, F. D., Daniel, J. L. P., Siqueira, G. R. 2018. Fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silage treated with different doses of *Lactobacillus buchneri* or a combination of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici*. *Journal of dairy science*, 101(5): 4158-4167. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13797>.
- Souza, C. G.; Moura, A. K. B.; Silva, J. N. P.; Soares, K. O.; Silva, J. V. C., & Vasconcelos, P. C. 2019. Fatores antinutricionais de importância na nutrição animal: Composição e função dos compostos secundários. *Pubvet*, v. 13, p. 166, <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n5a327.1-19>
- Souza, A. E., et al. 2018. Estudo Da Produção Do Milho No Brasil. *South American Development Society Journal*, [S.l.], v. 4, n. 11, p. 182, ago. DOI: <http://dx.doi.org/10.24325/issn.2446-5763.v4i11p182-194>
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Science*. 18: 104–111.
- Tricarico, J. M., Johnston, J. D., Dawson, K. 2008. A Dietary supplementation of ruminant diets with an *Aspergillus oryzae* α -amylase. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 136-150. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.017>
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, v.74, n.10, p.3583-3597,

- Verbic, J., Chen, X.B., Macleod, N.A., Orskov, E. R. 1990. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. *Journal of Agricultural Science*, 114(3): 243-248.
- Woolford, M. K. 1990. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(2): 101–116.
- Zeoula, L. M. et al. 1999. Solubilidade e Degradabilidade Ruminal do Amido de Diferentes Alimentos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 28(5): 898–905.

Tabela 1

Proporção dos ingredientes e composição química da ração.

	Dieta
Ingredientes (g/kg)	
Feno de Tifton	370
Silagem de milho reidratado	380
Grão de soja cru	220
Núcleo mineral ¹	30
Composição nutricional (g/kg MS)	
Matéria seca	761
Matéria orgânica	906
Proteína bruta	139
Extrato etéreo	57.7
Amido	323
Fibra em detergente neutro	325
Fibra em detergente ácido	145
Lignina	35.3
Carboidrato não-fibroso	392
Cinzas	94.4
Nutrientes digestíveis totais	712
Energia líquida de ganho, MJ/kg	6.78

¹Composição: 134 g Ca, 60 g P, 10 g Mg, 110 g Na 12 g S, 30 mg Se, 60 mg I, 150 mg Co, 6,000 mg Zn, 2,500 mg Fe, 4,500 mg Mn.

Tabela 2 – Composição bromatológica no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais.

Item	Tratamentos experimentais ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CONT	AMI	PROT	AMI+PROT		AMI	PROT	AMI*PROT
g/kg								
Matéria seca	575.97 ^a	539.19 ^b	557.36 ^{ab}	545.70 ^b	3.109	<.0001	0.080	0.0009
Matéria orgânica	980.63	977.20	979.01	970.51	1.966	0.135	0.293	0.518
Proteína bruta	93.43	88.60	84.80	81.61	2.264	0.376	0.092	0.855
Extrato etéreo	55.21	52.89	54.55	57.76	1.883	0.166	0.192	0.495
FDN	137.71	170.22	120.82	116.04	3.557	0.024	0.085	0.355
Amido	615.12 ^{ab}	601.02 ^b	642.02 ^a	638.02 ^a	4.221	0.002	0.041	0.012

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90 UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de AMI = alfa- amilase; PROT = protease AMI*PROT= interação amilase e protease, FDN= fibra em detergente neutro.

Tabela 3 - Perdas fermentativas em função dos tratamentos experimentais.

Item	Tratamentos experimentais ¹				EPM ¹	Valor de P ³		
	CONT	AMI	PROT	AMI+PROT		AMI	PROT	AMI*PROT
Perdas (%)								
Gases (MN)	1.21	7.89	4.77	9.11	0.671	<.0001	0.002	0.102
Efluente (MN)	1.83 ^b	10.72 ^a	9.97 ^a	9.29 ^a	0.819	<.0001	0.007	<.0001
Gases (MS)	7.96 ^a	5.77 ^b	0.694	5.91 ^b	0.595	0.024	<.0001	<.0001
Efluente (MS)	1.11	7.71	4.48	8.78	0.649	<.0001	0.002	0.082
Total (MS)	9.07 ^b	13.48 ^a	5.18 ^c	14.70 ^a	0.898	<.0001	0.245	0.032
Recuperação (MS)	90.92 ^b	86.51 ^c	94.81 ^a	85.29 ^c	0.898	<.0001	0.245	0.032

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90

UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da

média). ³Probabilidade de efeito de AMI = alfa-amilase; PROT = protease; AMI*PROT= interação

amilase e protease.

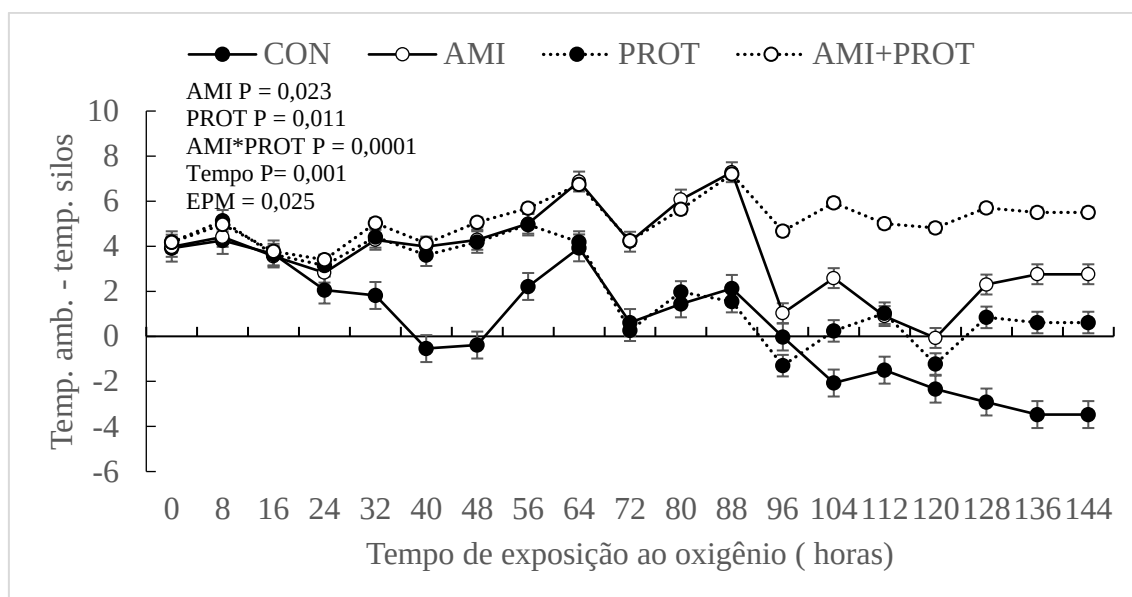


Figura 1- Diferença da temperatura do ambiente e silos experimentais de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio.

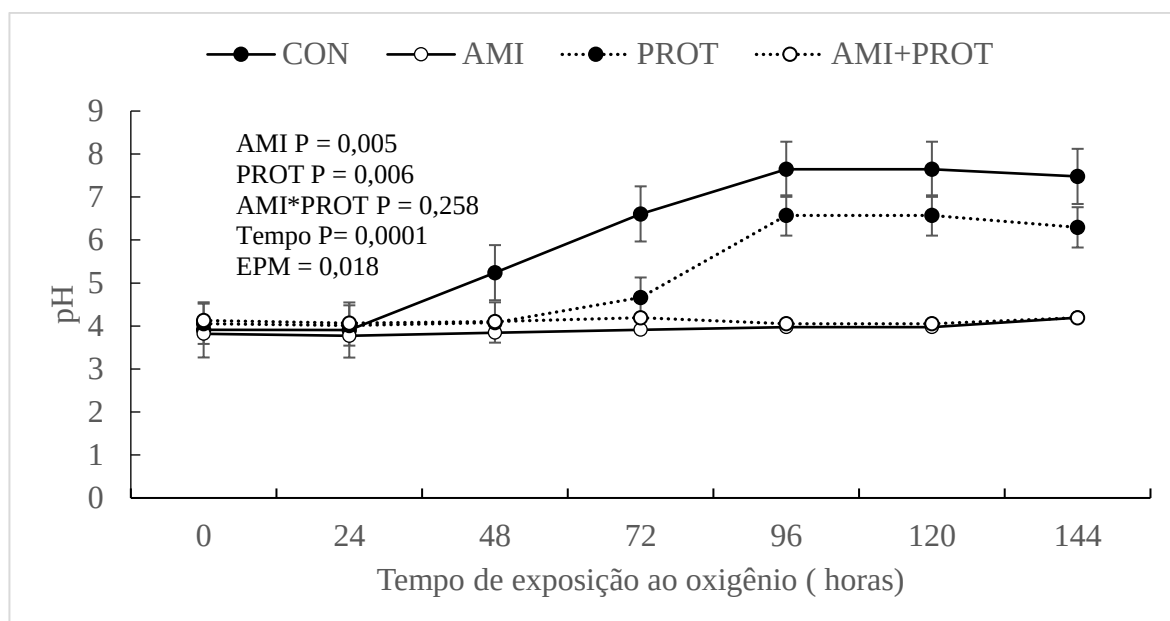


Figura 2 - pH de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio

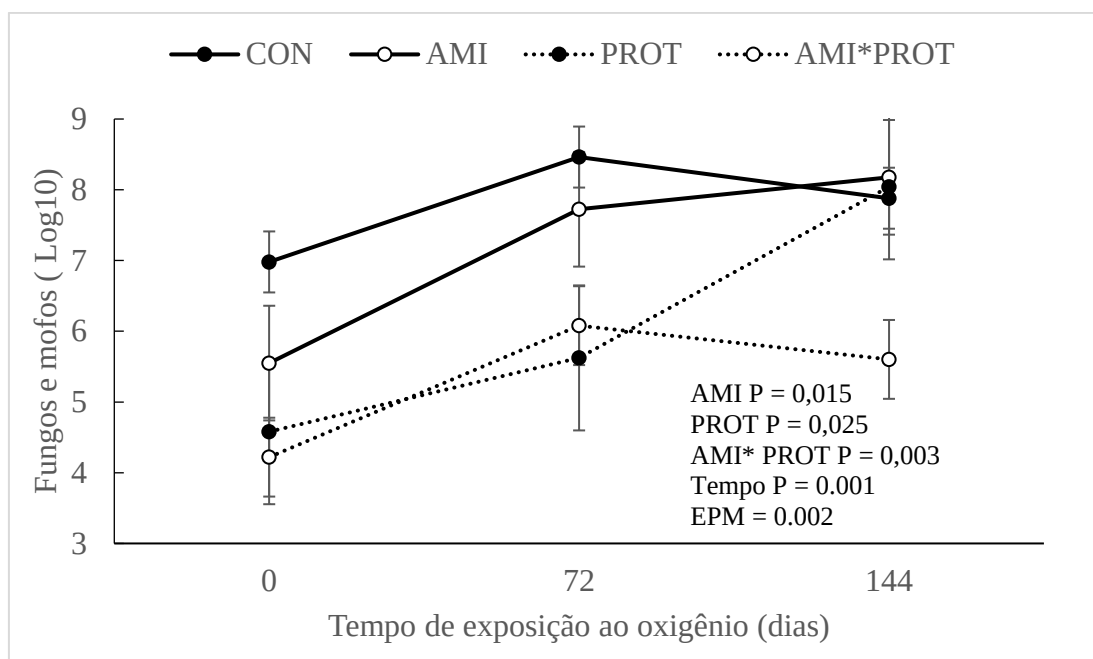


Figura 3- População de fungos e mofos de acordo com os níveis de protease em função do tempo de exposição ao oxigênio.

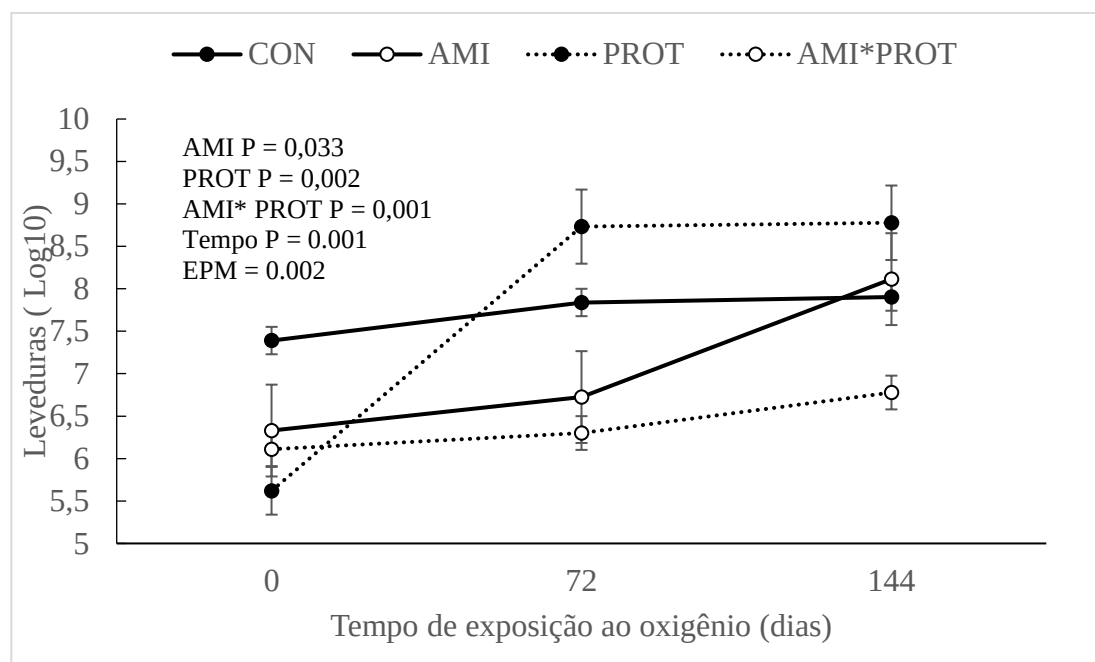


Figura 4- População de leveduras de acordo com os tratamentos em função do tempo de exposição ao oxigênio.

Tabela 4

Perfil microbiano e fermentativo no momento da abertura dos silos em função dos tratamentos experimentais

Item	Tratamentos experimentais ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CONT	AMI	PROT	AMI+PROT		AMI	PROT	AMI*PROT
<i>População de microrganismo (log₁₀)</i>								
Bactérias ácido lácticas	4.90 ^c	7.38 ^{ab}	5.43 ^b	8.48 ^a	0.102	0.041	0.022	0.035
Bactérias totais	4.92 ^c	7.56 ^b	7.49 ^b	8.36 ^a	0.114	0.085	0.066	0.021
Fungos e mofos	6.98	5.55	4.58	4.22	0.122	0.025	0.033	0.124
Leveduras	7.39	6.33	5.62	6.11	0.098	0.012	0.033	0.214
<i>Perfil fermentativo</i>								
pH	3.91 ^b	3.81 ^b	4.05 ^{ab}	4.13 ^a	0.025	0.796	<.0001	0.0007
N-NH ₃ (mg/dl)	13.48 ^b	9.53 ^c	25.73 ^a	13.10 ^b	1.379	<.0001	<.0001	0.008
mmol/kgMS								
Etanol	8.50	8.05	7.43	7.03	4.531	0.529	0.319	0.634
Lactato	4.89 ^c	5.48 ^b	7.74 ^a	5.86 ^b	0.296	0.165	0.002	0.011
Acetato	7.12	7.37	8.18	8.95	0.390	0.516	0.100	0.744
Propionato	0.670	0.701	0.697	0.759	0.024	0.403	0.370	0.757
Butirato	1.49	1.50	1.01	2.77	0.311	0.158	0.512	0.161
Isobutirato	0.768	0.804	0.806	0.804	0.017	0.909	0.863	0.398
Valerato	0.899	0.941	0.863	0.857	0.024	0.310	0.001	0.169
Isovalerato	1.08	1.12	1.06	1.08	0.010	0.571	0.600	0.824
AGCR	2.75	2.86	2.73	2.72	0.036	0.485	0.275	0.366
Total	16.92	17.92	20.39	21.06	0.598	0.438	0.005	0.879

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90 UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de AMI = alfa- amilase; PROT = protease AMI*PROT= interação amilase e protease

Tabela 5
Degradabilidade das silagens experimentais.

Item	Tratamentos experimentais ¹								Valor de P ³		
	CONT		AMI		PRO		AMI+PRO		AMI	PRO	AMI*PRO
A	667	± 17.7	617	± 17.3	802	± 17.7	739	± 17.7	0.096	<0.001	0.841
B	92.0	± 19.40	89.5	± 19.68	45.3	± 19.40	39.7	± 19.51	0.745	0.158	0.916
A+B	759	± 7.9	707	± 10.1	847	± 7.9	779	± 8.2	<0.001	<0.001	0.852
KDB, 1/h	21.2		0.759		22.7		19.3		-	-	-
DE 4%	758	± 7.9	702	± 8.7	847	± 7.9	779	± 8.2	<0.001	<0.001	0.851
DE 8%	758	± 7.9	698	± 8.0	847	± 7.9	778	± 8.2	<0.001	<0.001	0.851
DE 12%	758	± 7.9	694	± 7.7	847	± 7.9	778	± 8.1	<0.001	<0.001	0.851

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90 UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²Probabilidade de efeito de AMI = alfa-amilase; PROT = protease AMI*PROT= interação amilase e protease

Tabela 6

Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes de acordo com as dietas experimentais.

Item	Tratamentos experimentais ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CONT	AMI	PROT	AMI+PROT		AMI	PROT	AMI*PROT
<i>Consumo (kg/dia)</i>								
Matéria seca	0.990	1.043	0.954	0.970	0.078	0.834	0.742	0.911
Matéria orgânica	0.835	0.880	0.804	0.818	0.066	0.834	0.742	0.911
Proteína bruta	0.130	0.116	0.130	0.130	0.009	0.727	0.715	0.709
Extrato etéreo	0.022	0.020	0.017	0.025	0.002	0.515	0.988	0.267
FDN	0.258	0.318	0.264	0.306	0.031	0.438	0.964	0.894
Amido	0.376	0.427	0.419	0.417	0.032	0.724	0.811	0.696
<i>Consumo</i>								
% peso vivo	2.27	2.62	2.51	2.34	0.149	0.774	0.958	0.412
% peso metabólico	5.79	6.50	6.16	5.87	0.344	0.777	0.854	0.492
<i>Digestibilidade (g/kg)</i>								
Matéria seca	616.23	608.88	733.38	733.16	24.900	0.936	0.016	0.940
Matéria orgânica	649.69	641.95	773.20	772.98	26.252	0.937	0.015	0.925
Proteína bruta	685.03	684.31	701.03	699.70	15.435	0.974	0.631	0.992
Extrato etéreo	818.13	850.71	796.12	882.17	14.892	0.048	0.870	0.361
FDN	485.35 ^c	516.44 ^b	565.17 ^{ab}	650.41 ^a	28.682	0.305	0.064	0.032
Amido	876.44 ^b	839.09 ^b	865.26 ^b	944.94 ^a	13.845	0.115	0.225	0.023

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90 UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de AMI = alfa-amilase; PROT = protease AMI*PROT= interação amilase e protease.

Tabela 7

Fermentação ruminal de acordo com as dietas experimentais.

Item	Tratamentos experimentais ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CONT	AMI	PROT	AMI+PROT		AMI	PROT	AMI*PROT
pH	5.99	5.79	6.05	5.97	0.100	0.012	0.225	0.556
N-NH ₃ (mg/dL)	20.16	18.67	29.26	22.75	1.945	0.554	0.012	0.558
<i>mmol/L</i>								
Acetato	48.33	54.00	55.05	54.28	1.555	0.271	0.438	0.310
Propionato	26.15	27.22	28.23	26.33	1.243	0.875	0.821	0.573
Butirato	10.97	10.48	9.29	9.27	0.761	0.872	0.366	0.883
Isoburirato	1.41	0.834	1.78	0.840	0.166	0.122	0.016	0.579
Valerato	1.66	1.32	2.58	1.69	0.241	0.205	0.015	0.558
Isovalerato	1.43	1.35	2.84	1.31	0.425	0.255	0.002	0.487
AGCR	4.51	3.47	7.21	3.85	0.562	0.178	0.005	0.878
Total	90.94	88.27	93.14	87.82	0.966	0.188	0.002	0.879
Acetato:Propionato	2.01	2.08	2.25	2.18	0.138	0.990	0.560	0.803

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90 UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de AMI = alfa- amilase; PROT = protease AMI*PROT= interação amilase e protease.

Tabela 8

Balanço de nitrogênio e síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais.

Item	Tratamentos experimentais ¹				EPM ²	Valor de P ³		
	CONT	AMI	PROT	AMI+PROT		AMI	PROT	AMI*PROT
<i>Consumo (g/dia)</i>								
Nitrogênio	20.91	20.84	18.67	20.86	1.440	0.727	0.715	0.709
<i>Excreção (g/dia)</i>								
Fezes	6.77	6.65	5.62	6.29	0.584	0.822	0.540	0.743
Urina	8.15	7.5888	6.95	6.72	0.644	0.767	0.447	0.901
<i>Balanço (g/dia)</i>								
Absorvido	14.13	14.19	13.05	14.56	1.018	0.715	0.869	0.735
Retido	5.98	6.60	6.09	7.84	0.775	0.467	0.675	0.729
<i>Síntese microbiana (g/dia)</i>								
Nitrogênio	8.85 ^c	9.05 ^c	11.58 ^b	14.55 ^a	1.106	0.223	0.085	0.023
Proteína bruta	55.32 ^c	56.57 ^c	72.38 ^b	90.94 ^a	6.917	0.223	0.085	0.023

¹CONT (sem adição enzimática); AMI (adição de 300 ml/ton de alfa-amilase atividade enzimática de 90 UI/kg); PROT (adição de 500 g/ton de protease atividade de protease 600 UI/g). ²EPM (erro padrão da média). ³Probabilidade de efeito de AMI = alfa-amilase; PROT = protease; AMI*PROT= interação amilase e protease.