



GILSON SEBASTIÃO DIAS JÚNIOR

**PROCESSAMENTO DE SILAGEM DE MILHO E
SUPLEMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS
COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS**

LAVRAS - MG

2016

GILSON SEBASTIÃO DIAS JÚNIOR

**PROCESSAMENTO DE SILAGEM DE MILHO E SUPLEMENTAÇÃO
DE VACAS LEITEIRAS COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira
Coorientador

LAVRAS – MG
2016

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Dias Júnior, Gilson Sebastião.

Processamento de silagem de milho e suplementação de vacas
leiteiras com enzimas fibrolíticas / Gilson Sebastião Dias Júnior. –
Lavras : UFLA, 2016.

179 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Silagem de milho. 2. Enzimas fibrolíticas. 3. Tamanho de
partícula. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

GILSON SEBASTIÃO DIAS JÚNIOR

**PROCESSAMENTO DE SILAGEM DE MILHO E SUPLEMENTAÇÃO
DE VACAS LEITEIRAS COM ENZIMAS FIBROLÍTICAS
CORN SILAGE PROCESSING AND SUPPLEMENTATION OF
FIBROLYTIC ENZYMES FOR LACTATING DAIRY COWS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA 22 de abril de 2016.

Prof. Dr. Gustavo Augusto Andrade	IFSULDEMINAS/Machado
Dra. Renata Apocalipse Nogueira Pereira	EPAMIG
Prof. Dra. Marina de Camargo Danés	UFLA
Prof. Dr. Luiz Felipe Ferraretto	Universidade da Flórida/EUA

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

LAVRAS – MG

2016

Aos;
aos meus pais
Gilson Sebastiao Dias e Vilméia Beluti Dias,
aos meus irmãos
Henrique, e Gisele.
Ao meu sobrinho
Pedro Henrique.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, por iluminar meus caminhos, colocando sempre em minha vida, anjos providos da capacidade de me guiar e ajudar, e que me permitiu vencer mais esta etapa.

Ao meu orientador, Professor Marcos Neves Pereira pela imensa dedicação a minha formação, e principalmente pela visão de ciência que tive a oportunidade de vivenciar e aprender durante todo o nosso intenso convívio ao longo deste curso e a minha Coorientadora Dr. (a). Renata Apocalypse Nogueira Pereira por todo aprendizado e convivência, principalmente pelo envolvimento me apoiando nos momentos difíceis e a ambos por terem depositado em mim, confiança, apoio e incentivo, meus mais sinceros agradecimentos.

Aos membros da banca examinadora

Aos professores pela contribuição direta em minha formação acadêmica durante o Doutorado e a todos os professores do DZO que se empenham no propósito de ensinar e fazer ciência animal.

Aos laboratoristas do DZO e do DCA, em especial ao Márcio a Tina, por colaborar na parte laboratorial e análises. E a todos os funcionários do DZO, em especial ao Carlos atuando na Secretaria de Pós-Graduação pelo apoio durante todas as etapas.

As Fazendas São Francisco oportunidade de realizar as etapas experimentais utilizando animais de seus plantéis e todos os seus funcionários pelo empenho e dedicação na realização laboriosa desta etapa experimental.

Aos colegas e amigos de Pós-Graduação e participantes do Grupo do Leite agradeço imensamente a todos pela imprescindível participação durante a execução dos experimentos e análises laboratoriais; e pelo apoio, companheirismo, amizade e intenso convívio.

À todos os integrantes do Grupo do Leites da UFLA, em especial e a todos os integrantes que de forma direta ou indiretamente participaram deste trabalho, ficam meus agradecimentos pela imensurável colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, apoiando financeiramente a realização desta pós-graduação.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, por me proporcionarem realizar mais esta etapa de formação profissional em excelentes condições.

À empresa NOGUEIRA, na pessoa de Edson Michilini, pelo apoio financeiro e em especial a disponibilização das máquinas para a avaliação do processamento da silagem de milho.

À ALTECH, na pessoa de Winston pelo apoio financeiro durante o estudo de enzimas fibrolíticas.

Aos meus pais Gilson e Vilméia; meus irmãos, Henrique e Gisele e minha namorada Rafaela. Aos integrantes da minha família, todos os meus tios, sobrinhos, primos e a todos os meus familiares pelo carinho e apoio em todas as etapas da minha vida e ao longo deste Doutorado e que sempre incentivaram, torceram, vibraram e compartilharam comigo cada vitória.

Aos meus amigos pela verdadeira amizade e apoio.

Em especial, cooperar nos momentos mais difíceis, meus mais sinceros e carinhosos agradecimentos.

Aos meus amigos da UFLA, e todos que contribuíram de alguma forma, para a realização deste árduo trabalho, fica meus sinceros e profundos agradecimentos.

RESUMO GERAL

A forragem de milho possui alto potencial de produção de matéria seca por unidade de área cultivada e alta concentração de energia por unidade de matéria seca produzida, majoritariamente oriunda do amido presente nos grãos. O pequeno tamanho de partícula desta forragem é vantajoso para os processos de ensilagem e práticas alimentares do rebanho, mas pode reduzir o conteúdo de fibra fisicamente efetiva em dietas com alta inclusão de silagem de milho para vacas leiteiras. O processamento da silagem durante a colheita mecanizada determina o valor nutricional do alimento, por afetar a digestibilidade, a fisiologia ruminal e o desempenho leiteiro. Três experimentos foram conduzidos avaliando o grau de processamento da forragem de milho. O objetivo do primeiro experimento foi avaliar o efeito do tamanho teórico de partículas (3; 4,5; 6 e 8,5 mm) e da presença de um processador de grãos em uma colhedora de milho de uma linha sobre o grau de processamento do alimento. A utilização da colhedora com quebrador de grãos e com tamanho de partículas 8,5 mm foi o mais efetivo em processar a fração grãos da planta com a mínima redução no tamanho de partícula da fração fibrosa. O segundo experimento buscou avaliar a resposta de vacas leiteiras a dietas formuladas com 31,7% da matéria seca de silagem de milho colhida com 3 mm e sem quebrador de grãos (a forma predominante no Brasil) ou 8,5 mm e com quebrador de grãos. Também foi avaliado a suplementação destas dietas com enzimas fibrolíticas, em arranjo fatorial 2 x 2 de tratamentos. Dezesesseis vacas foram alimentadas individualmente em quadrados latinos 4 x 4, com períodos de 21 dias e mensuração da resposta aos tratamentos na 3^a semana. A silagem com partículas mais longas melhorou o desempenho leiteiro e a função ruminal. As enzimas fibrolíticas melhoraram a digestibilidade da fibra no trato digestivo total apenas quando suplementaram a dieta com silagem de fibra curta, mas tenderam a induzir acidose ruminal nos animais. O experimento 3 avaliou o relacionamento entre características físicas dos grãos de milho na silagem e o Kernel Processing Score (KPS), uma técnica laboratorial para mensuração do grau de processamento dos grãos na forragem de milho. O grau de processamento dos grãos na silagem foi melhor descrito pelo diâmetro geométrico médio das partículas após separação hidrodinâmica e estratificação da amostra por peneiras. Enzimas fibrolíticas podem ter efeito benéfico sobre a digestibilidade em dietas com baixo teor de fibra fisicamente efetiva, capazes de deprimir a digestibilidade da fibra no rúmen. A avaliação dos grãos na silagem de milho por técnica de flotação e peneiramento em peneiras foi mais descritiva do grau de processamento dos grãos que o KPS.

Palavras-chave: Amido. Digestibilidade. FDN fisicamente efetivo. Fibra efetiva. Tamanho de partícula.

GENERAL ABSTRACT

Corn silage has high potential for dry matter production per area and high concentration of energy per unit of dry matter produced, mostly derived from the starch in kernel fraction. Processing the silage into small particle size is advantageous for the ensiling process and feeding practices but may reduce the physically effective fiber content in diets with high inclusion of corn silage for dairy cows. Processing at harvest determines feed nutritional value, thereby affecting digestibility, ruminal physiology, and lactation performance by dairy cows. Three experiments were conducted to evaluate the degree of kernel processing of the corn silage. The objective of the first experiment was to evaluate the theoretical length of cut (3, 4.5, 6 and 8.5 mm) and presence of a kernel processor in a one-row harvester on degree of forage processing. The use of the harvester with a kernel processor and 8.5 mm particle size was more effective in processing the kernel fraction of the plant with minimal reduction in particle size of the stover fraction. The second experiment aimed to evaluate the response of dairy cows to diets with 31.7% of dry matter of corn silage harvested at 3 mm without kernel processor (the predominant method in Brazil) or at 8.5 mm with kernel processor. The supplementation of diets with fibrolytic enzymes was also evaluated, in 2 x 2 factorial design. Sixteen cows were individually fed in 4 x 4 Latin squares, with 21-day periods, and responses to treatment measured in the third week. Silage with longer particles improved the dairy performance and rumen function. The fibrolytic enzymes improved total tract fiber digestibility only in the short-fiber silage diets, but tended to induce ruminal acidosis. Experiment 3 evaluated the relationship between physical characteristics in the kernel fraction of corn silage and Corn Silage Processing Score (CSPS), a laboratory technique for measuring the degree of kernel processing in corn forage. The degree of kernel processing in the corn silage was better described by the geometric mean particle size after hydrodynamic separation and dry sieving of samples. Fibrolytic enzymes can improve digestibility in low physically effective fiber diets, which may reduce fiber digestibility in the rumen. The evaluation of corn silage kernel fraction by flotation technique and dry-sieving were provided a better description of degree of kernel processing than the KPS.

Key words: Starch. Digestibility. Physically effective NDF. Effective fiber. Particle size.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular dos vegetais.	44
Figura 2 - Estrutura da parede celular vegetal.	44
Figura 3 - Formação da ligação celobiose, através da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose.	45
Figura 4 - Esquematisação da estrutura da fibra de celulose.	46
Figura 5 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.	52

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1. Plasma urea nitrogen (PUN) over time of dairy cows supplemented (■) or not (Δ) with fibrolytic enzymes (FB). P = 0.07 for FB, P = 0.32 for particle size (PS), P = 0.70 for PS x FB, P < 0.01 for hour, P = 0.05 for FB x hour, P = 0.41 for PS x hour, P = 0.38 for FB x PS x hour. SEM= 0.975. Symbol (*) P < 0.01 (slice option).	142
---	-----

ARTIGO 2

Figure 1. Relationship between ruminal in situ DM disappearance (% of DM) and geometric mean particle size (μ m) in unfermented kernel. Prediction equation for 3 h: $y = 31.58 (\pm$ $4.53) - 0.007 x (\pm 0.01) - 4.170 x^2 (\pm 2.42)$; $n = 7$, RMSE = 2.10, $R^2 = 0.89$, $P = 0.01$. Prediction equation for 6 h: $y =$ $45.11 (\pm 2.42) - 0.007 x (\pm 0.01) - 2.428 x^2 (\pm 1.21)$; $n = 7$, RMSE = 1.05, $R^2 = 0.99$, $P = 0.001$. Prediction equation for 12 h: $y = 62.13 (\pm 6.74) - 0.004 x (\pm 0.01) - 5.909 x^2 (\pm$	
---	--

3.60); n = 7, RMSE = 3.12, R² = 0.97, P = 0.001. Prediction equation for 24 h: y = 66.65 (± 4.47) + 0.001 x (± 0.01) – 0.001 x² (± 2.39); n = 7, RMSE = 2.07, R² = 0.99, P = 0.001..... 176

Figure 2. Relationship between ruminal in situ DM disappearance (% of DM) and surface area (cm²/g) in unfermented kernel. Prediction equation for 3 h: y = 3.15 (± 2.25) + 0.507 x (± 0.39) + 0.015 x² (± 0.01); n = 7, RMSE = 0.40, R² = 0.95, P = 0.001. Prediction equation for 6 h: y = -3.186 (± 1.50) + 5.130 x (± 0.38) – 0.117 x² (± 0.01); n = 7, RMSE = 0.93, R² = 0.99, P = 0.001. Prediction equation for 12 h: y = - 19.44 (± 3.87) + 6.979 x (± 0.66) – 0.167 x² (± 0.02); n = 7, RMSE = 2.41, R² = 0.98, P = 0.001. Prediction equation for 24 h: y = - 23.30 (± 7.40) + 10.660 x (± 1.27) – 0.285 x² (± 0.05); n = 7, RMSE = 4.60, R² = 0.96, P = 0.001. 177

Figure 3. Relationship between corn silage processing score (CSPS: % of starch passing through 4.75 mm sieve) and proportion of hydrodynamically separated kernel-fraction passing through 4.75 mm sieve in whole-plant corn silage. Corn silage processing score prediction equation: y = 37.55 (± 4.54) + 0.39x (± 0.06); n = 80, RMSE = 4.96, R² = 0.34, P <0.01..... 178

Figure 4. Simulations of the effect of kernel-fraction geometric mean particle size (µm) on starch fermentation rate (%/h; Panel A) and ruminal and total tract starch digestibilities (% of starch; Panel B and C, respectively) performed using the Feed Grain V2.0 Evaluation System. 179

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

- Table 1. Ruminant DM degradation (DEG) of visible corn kernels differing in degree of damage after 12, 30, and 72 h of *in situ* incubation. 131
- Table 2. Visible kernels (I = Intact. D = Damaged. ED = Extremely Damaged) and cobs (W = Whole. B = Broken) and particle size (using Penn State Particle Separator) of corn harvested at 3, 4.5, 6, and 8.5 mm theoretical length of cut (TLOC), with or without (noKP) kernel processor (KP) 132
- Table 3. Fermentation profile, composition, particle size, rate of harvesting and density of whole plant corn silage differing in theoretical length of cut (SHORT, LONG) and the Standard silage. (16 samples/silage. Mean \pm SD)..... 134
- Table 4. Ingredient composition of the offered TMR, nutrient composition of the consumed diets, and diet particle size on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes. 135
- Table 5. Intake, lactation performance, milk urea-N (MUN), and feed efficiency on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes. 136
- Table 6. Chewing pattern on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes. 137

Table 7. Feed sorting behavior in periods of the day on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes. (> 100 = preferential intake, < 100 = refusal, 100 = no selection)	138
Table 8. Ruminal fluid VFA, pH, and protozoa concentration on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes.	139
Table 9. Total tract apparent digestibility (% of intake), allantoin in urine, plasma glucose 12 h post-feeding, and plasma urea nitrogen (PUN) over time on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes.	140
Table 10. Visible corn kernels in feces (I = Intact, D = Damaged) and fecal DM, pH, and viscosity on treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes.	141

ARTIGO 2

Table 1. Particle size distribution, geometric mean particle size (GMPS) and surface area of unfermented kernels. ¹	171
Table 2. Ruminal in situ DM disappearance (% of DM) of unfermented kernels. ^{1,2,3}	172
Table 3. Descriptive statistics of nutrient composition and corn silage processing score (CSPS) in whole-plant corn silage and hydrodynamically separated kernel-fraction nutrient	

	composition, particle size distribution, surface area and geometric mean particle size (GMPS).....	173
Table 4.	Linear relationship between corn silage processing score (% starch passing through a 4.75 mm sieve) in whole-plant corn silage and hydrodynamically separated kernel-fraction geometric mean particle size (GMPS), surface area, and retained proportion on sieves of varied particle size.....	174
Table 5.	Quadratic relationships between hydrodynamically separated kernel particles retained at 2.36 mm sieve or passing through the 4.75 mm sieve and hydrodynamically separated kernel-fraction geometric mean particle size (GMPS, μm) and surface area (cm^2/g).....	175

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	15
1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Tamanho de partículas	19
2.1.1	Introdução	19
2.1.2	Histórico e mensuração do tamanho de partículas	19
2.1.3	Tamanho de partículas e FDN fisicamente efetivo	23
2.1.4	Tamanho de partículas e mat ruminal	25
2.1.5	Tamanho de partículas e a função ruminal	27
2.1.6	Tamanho de partículas e fermentabilidade da dieta	29
2.1.7	Tamanho de partículas e desempenho de vacas leiteiras	31
2.1.8	Tamanho de partículas e processamento de grãos da silagem de milho	35
2.2	Enzimas fibrolíticas	41
2.3	Constituição da parede celular da planta	43
2.3.1	Classificação das enzimas	50
2.3.2	Origem e caracterização das enzimas fibrolíticas	50
2.3.3	Ação enzimática no desempenho, fisiologia e digestibilidade de vacas leiteiras	54
2.3.4	Enzimas fibrolíticas exógenas	56
2.3.5	Estabilidade das enzimas no aparelho digestório	58
2.3.6	Determinação da atividade enzimática	61
2.3.7	Efeito do tratamento enzimático no comportamento ingestivo e ambiente ruminal	62
2.3.8	Efeito de enzimas fibrolíticas na população microbiana ruminal .	63
2.3.9	Efeito de enzimas fibrolíticas sobre o desempenho animal	66
	REFERÊNCIAS	75
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	93
	ARTIGO 1 - RESPONSE OF LACTATING DAIRY COWS TO CORN SILAGE DIFFERING IN MECHANICAL PROCESSING AND FIBROLYTIC ENZYME SUPPLEMENTATION	93
	ARTIGO 2 - RELATIONSHIP BETWEEN PROCESSING SCORE AND KERNEL-FRACTION PARTICLE SIZE IN WHOLE-PLANT CORN SILAGE	143

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A silagem da forragem de milho é a principal forrageira para gado leiteiro confinado ou semi-confinado no Brasil (COSTA et al., 2013). A silagem de milho é um alimento rico em energia, composto por fração vegetativa rica em Fibra em Detergente Neutro (FDN) e fração de grãos rica em amido. A forma física da FDN impacta a fermentação ruminal, o desempenho e a longevidade de vacas leiteiras (ZEBELI et al., 2012). Silagens com FDN finamente moído podem induzir acidose ruminal e queda na digestibilidade da FDN no rúmen, por ação negativa da deficiência nutricional de FDN fisicamente efetivo (peFDN) sobre funções fisiológicas vitais de ruminantes, como a mastigação durante a ingestão e a ruminação, a secreção de saliva e a motilidade do rúmen. Silagens com FDN em partículas longas (alto peFDN) são desejáveis quando se almeja obter alta secreção vitalícia de sólidos do leite por vacas alimentadas com dietas contendo alto teor de silagem de milho.

Entretanto, silagens de milho de alto peFDN podem ter alta proporção de grãos não danificados e, portanto, podem ter baixa digestibilidade do amido no trato digestivo total. Falta de processamento do grão pode ser mais danoso à digestibilidade do amido e ao desempenho leiteiro quando o milho cultivado tem endosperma de alta vitreosidade e de baixa digestibilidade, como os cultivados no Brasil (CORREA et al., 2002). A digestibilidade de grãos pouco processados também será menor quanto maior for o estágio de maturidade da planta na colheita (JOHNSON et al., 2002). A obtenção de alta massa de silagem de milho por hectare requer que a colheita seja realizada quando a planta apresenta teor de matéria seca (MS) ao redor de 35%, ou seja, plantas em estágio de maturidade posterior à metade da linha do leite (WIERSMA et al., 1993), sendo mais

propensas a terem queda na digestibilidade por processamento deficiente dos grãos.

A ensilagem do milho no Brasil é predominantemente realizada por colhedoras de uma linha (BERNARDES; RÉGO, 2015), um equipamento de baixo custo e coerente à baixa escala de produção das fazendas leiteiras e à topografia muitas vezes acidentada das áreas de cultivo. Neste tipo de colhedora, o dano de grãos é normalmente obtido por redução no tamanho teórico de corte (TTP), o que também reduz o tamanho de partícula (TP) da FDN na forragem. Colhedoras de forragem que danificam os grãos, sem reduzir demasiadamente o TP da FDN, são desejáveis (SHINNERS et al., 2010; WEISS; WYATT, 2000), principalmente quando o intuito é formular dietas com alta inclusão de silagem de milho, mas com a mínima inclusão de outras forrageiras com tamanho longo de partículas, o que é normalmente mais eficiente tanto do ponto de vista agrônômico quanto financeiro, no Brasil.

Ao longo das últimas décadas, a pesquisa tem buscado melhorar a digestibilidade da fração fibrosa da forragem de milho, seja pela alteração na composição genética dos híbridos (JUNG; SAMAC; SARATH, 2012), ou através de métodos químicos ou biológicos aplicados durante o armazenamento (LYNCH; BAAH; BEAUCHEMIN, 2015), ou oferta da silagem (YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 2000). A suplementação de vacas leiteiras com enzimas fibrolíticas pode ser uma alternativa para aumentar a digestibilidade da FDN e o aporte de energia para o animal (COLOMBATTO et al., 2003a). Entretanto, o mecanismo de ação destas enzimas ainda não foi completamente elucidado (ADESOGAN et al., 2014; BEAUCHEMIN et al., 2000). A resposta de vacas leiteiras à suplementação enzimática pode depender do tipo e dose da enzima, da categoria animal, da composição da dieta basal, dentre outros fatores (ADESOGAN et al., 2014).

Os objetivos deste trabalho são:

- a) Avaliar o processamento das frações FDN e grãos de silagens de milho colhidas com colhedora de uma linha diferindo no tamanho teórico médio das partículas e presença ou não de quebrador de grãos;
- b) Avaliar a resposta de vacas leiteiras em desempenho, consumo e digestibilidade à variação no grau de processamento da silagem de milho colhida com máquina de uma linha;
- c) Avaliar a resposta de vacas leiteiras à suplementação de dietas diferindo no grau de processamento da silagem de milho com enzimas fibrolíticas;
- d) Avaliar técnicas para mensuração do grau de processamento da silagem de milho.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tamanho de partículas

2.1.1 Introdução

O TP das forragens pode impactar a produtividade e a longevidade de vacas leiteiras. A redução no tamanho médio de partícula das forrageiras pode afetar negativamente a função ruminal, o que é mais relevante em dietas com alto teor de alimentos concentrados (mais que 50% da MS). Esse padrão de resposta animal tem sido observado para várias forrageiras, como silagem de milho (KONONOFF; HEINRICHS; BUCKMASTER, 2003), gramíneas temperadas (ZEBELI et al., 2007), alfafa (YANG; BEAUCHEMIN, 2007a) ou cevada (ALAMOUTI et al., 2009). Nesses experimentos, a redução no TP da forragem é normalmente associada à queda no pH ruminal e menor digestibilidade da fibra no rúmen e/ou no trato digestivo total, em decorrência da menor atividade de microrganismos fibrolíticos (WITZIG, 2009). Por outro lado, o aumento excessivo no TP da forragem pode inibir o consumo de matéria seca (CMS), favorecer o consumo preferencial ou rejeição de ingredientes da dieta e reduzir a taxa de ingestão pelo animal (KONONOFF; HEINRICHS, 2003; MAULFAIR; HEINRICHS, 2013; ZEBELI et al., 2008).

2.1.2 Histórico e mensuração do tamanho de partículas

As primeiras pesquisas sobre possíveis efeitos do TP dos alimentos em sistemas de produção de bovinos foram provavelmente iniciadas quando a indústria leiteira começou a conservar forragens, principalmente na forma de fenação. A desidratação artificial possibilitou a manutenção da qualidade química da forragem, pois permitiu a colheita e conservação durante a fase de máxima qualidade nutricional. O Instituto de Engenharia Agrícola da Universidade de Oxford iniciou experimentos a partir de 1924 para avaliar o tempo de exposição e a temperatura ideal para o processo de secagem artificial e

sua relação com a qualidade química da forragem (HUFFMAN, 1939). Fardos de forragem compactados eram confeccionados utilizando material longo ou picado grosseiramente. Com o intuito de diminuir a necessidade de espaço para armazenamento, as forragens fenadas foram moídas e compactadas, gerando peletes. Woodman, Bee e Griffith (1930) avaliaram a substituição total de concentrados por feno de alfafa, moído e peletizado e verificaram aumento na produção e no percentual de gordura no leite de vacas com produção ao redor de 18 L/d. Por outro lado, Hope et al. (1950) constataram que a produção de leite, em vacas produzindo cerca de 23 L/d, diminuiu quando 45% do concentrado composto por grãos de cereais foi substituído por peletes de gramíneas e leguminosas.

Blosser et al. (1952) compararam o efeito sobre o desempenho de vacas leiteiras de três processamentos de alfafa em substituição a 30% do concentrado composto por grãos. Os processamentos foram: alfafa desidratada, alfafa desidratada e moagem grosseira, ou alfafa desidratada, moagem fina e peletizada. Houve ligeiro aumento na produção de leite quando as vacas foram alimentadas com alfafa peletizada. Esse fato estimulou o uso de peletes em fazendas leiteiras e os resultados foram muito variados. Respostas positivas à substituição de concentrados por peletes de forragem ocorreram principalmente quando a proporção de forragem na dieta era alta (> 50% da MS) e em rebanhos com animais mais produtivos. Beardsley (1964) e Eaton et al. (1952) verificaram efeitos positivos da peletização sobre o consumo, o ganho de peso e a eficiência alimentar de bezerras em crescimento, com ganhos de 25, 98 e 36%, respectivamente. No entanto, os resultados para vacas de leite foram controversos. Ronning, Meyer e Clark (1959) forneceram feno de alfafa peletizado ou longo para vacas leiteiras e observaram que o CMS e as produções de leite e de leite corrigido para 4% de gordura foram maiores com alfafa peletizada. Outros autores observaram efeito negativo sobre a produção e o teor

de gordura do leite quando alfafa peletizada substituiu alfafa integral e esse efeito ocorreu principalmente em rebanhos mais produtivos (PALMQUIST; RONNING, 1961).

A queda no teor de gordura do leite de vacas alimentadas com forragem finamente moída tem sido relatada de longa data (POWELL, 1939). Em experimentos conduzidos por Porter et al. (1953), foi observado aumento na produção de leite e queda no teor de gordura no leite com a peletização da forrageira, similarmente ao observado por Ensor, Shaw e Tellechea (1959) e Soest (1955). Quando a forragem foi moída a 0,64 ou 0,80 cm (APPLEMAN; ADDIS, 1960) e a 0,95, 1,9 e 2,5 cm (HAENLEIN; RICHARDS; MITCHELL, 1962), ligeira depressão no teor de gordura do leite foi observada no menor TP. Moore (1964) compilou dados de vários experimentos e demonstrou como o valor nutritivo da forragem pode ser afetado pela forma física. De acordo com esse autor, as forragens ao serem finamente moídas, como para confecção de peletes, induzem queda na mastigação durante a ingestão e a ruminação. Isto pode resultar em menor salivação com menor tamponamento do rúmen. A maior superfície de contato quando o alimento é finamente moído também poderia aumentar a fermentabilidade ruminal e gerar maior acúmulo de ácidos orgânicos, e conseqüentemente induzir queda no pH do fluido. O menor TP da forragem peletizada também resultaria em aumento da taxa de passagem da digesta pelo retículo-rúmen, reduzindo a digestibilidade e induzindo aumento no CMS.

Vários trabalhos foram realizados a partir da década de 1960 para avaliar o relacionamento entre o TP das forragens e a produção e composição do leite (BELYEA; MARTZ; MBAGAYA, 1989; CASTLE; GILL; WATSON, 1981), a função ruminal (GILL; CAMPLING; WESTGARTH, 1966; VOSKUIL; METZ, 1973) e a digestibilidade (ROBINSON; SNIFFEN; SOEST, 1985; SOEST, 1966). Foram também avaliados o relacionamento entre TP da

dieta e a ocorrência de úlceras e deslocamento de abomaso (BREUKINK; DERUYTER, 1976), laminite (BRENT, 1976), cetose (FRONK; SCHULTZ; HARDIE, 1980) e queda no teor de gordura do leite (BALCH et al., 1955; CHALUPA et al., 1970; ERDMAN et al., 1980; LATHAM; SUTTON; SHARPE, 1974; MURDOCK; HODGSON, 1979; THOMAS, 1975).

Devido à importância nutricional do TP da dieta, houve a necessidade de sua mensuração. Assumiu-se que partículas visualizadas nas fezes, as que escaparam do rúmen, não estimulariam a ruminação. Baseado nessa premissa, estudos foram realizados na década de 80 para definir a dimensão dessas partículas. Poppi, Hendricksen e Minson (1985) verificaram que partículas maiores que 1,18 mm apresentavam maior resistência à passagem pelo rúmen. Esses autores realizaram experimentos mensurando o TO das fezes de vacas leiteiras alimentadas com mais de 40 dietas com diferentes teores de forragem. Eles observaram que menos de 5% das partículas fecais foram retidas em peneira com crivo de 3,35 mm e que a maioria ficou retida nos crivos de 0,4 e 1,18 mm. Mertens (1997) propôs que apenas partículas retidas no crivo de 1,18 mm seriam efetivas para estimular a ruminação.

Lammers, Buckmaster e Heinrichs (1996) propuseram a utilização de um conjunto de peneiras para avaliar o TP de dietas e forragens. O padrão para mensurar a distribuição de TP das forragens era o método S424.1 (AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE - ANSI, 1993). As peneiras do sistema ASAE continham aberturas nominais de 19; 12,7; 6,3; 3,96 e 1,17 mm. Lammers, Buckmaster e Heinrichs (1996) projetaram um separador simplificado com duas peneiras (19 e 8 mm) e um fundo. O objetivo dessa metodologia foi caracterizar *pools* de partículas de forma plausível de serem mensuradas na fazenda, por ser operado manualmente e realizável com a forragem fresca. O equipamento de peneiramento foi chamado Penn State Particle Separator (PSPS). Embora o aparelho original tenha sido amplamente aceito pelos

nutricionistas, alguns questionamentos surgiram com relação à falta de consideração das partículas menores do que 8 mm e que poderiam ter alguma efetividade física. Com base nos trabalhos de Mertens (1997), uma peneira adicional com crivo de 1,18 mm foi desenvolvida (KONONOFF; HEINRICHS; BUCKMASTER, 2003). A fim de obter resultados reproduzíveis, a agitação das peneiras deve seguir um procedimento padrão. Kononoff, Heinrichs e Buckmaster (2003) recomendam que o conjunto de peneiras deve ser agitado horizontalmente, girando as peneiras e movimentando cinco vezes em cada um dos quatro lados da caixa, repedindo a rotação duas vezes, em um total de 40 movimentos. Uma agitação horizontal é considerada como um movimento para trás e para frente ao longo de uma distância de 17 cm. Com base na distribuição de partícula mensurada com o Separador de Partículas da Penn State (SPPS), podem ser calculados o diâmetro geométrico médio (X_{gm}) e o desvio padrão geométrico (S_{gm}) da forragem ou dieta (KONONOFF; HEINRICHS; BUCKMASTER, 2003). A maioria da pesquisa atual envolvendo a mensuração do tamanho de partícula utiliza o método do SPPS (MAULFAIR; HEINRICHS, 2012).

2.1.3 Tamanho de partículas e FDN fisicamente efetivo

Vacas leiteiras requerem um teor mínimo de FDN na dieta para manter adequada função ruminal, funções fisiológicas vitais de ruminantes e teor de gordura no leite. O uso da FDN na formulação de dietas foi primeiramente proposto nas normas nutricionais norte-americanas de 1989 (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 1989). Este guia nutricional recomendava que a dieta deveria ter no mínimo 25% da MS de FDN, sendo que 75% da FDN deveria ser proveniente de forragens. Apesar de o sistema considerar a diferença de efetividade entre a FDN oriunda de forragens e a FDN em alimentos

concentrados, o sistema não distingue forragens diferindo no grau de processamento.

O conceito de peFDN foi definido como a capacidade da FDN de promover atributos fisiológicos vitais dependentes do tamanho de partícula da dieta, como mastigação (ingestão e ruminação), salivação, formação do mat ruminal e motilidade (ARMENTANO; PEREIRA, 1997). Este conceito integra aspectos químicos determinantes da digestibilidade e habilidade de troca de cátions da FDN e atributos físicos relacionados ao tamanho de partícula da FDN. Mertens (1997) propôs o uso de um fator de efetividade físico (pef) da FDN, que multiplica o teor de FDN no alimento, para cálculo da peFDN ($peFDN = FDN \times pef$). Os valores de pef foram inicialmente mensurados pela atividade de ruminação de bovinos alimentados com forragens variando no tamanho de partícula (BALCH, 1971; SUDWEEKS; ELY; SISK, 1981).

Lammers, Buckmaster e Heinrichs (1996) propuseram a mensuração do pef como a proporção da MS do alimento retida nas peneiras de 8 e 19 mm do SPPS ($pef_{>8}$). Posteriormente, Kononoff, Heinrichs e Buckmaster (2003) sugeriram a proporção do alimento retido acima do crivo de 1,18 mm como medida de pef ($pef_{>1,18}$). Em ambos os casos, no cálculo dos teores de $peFDN_{>8}$ ou $peFDN_{>1,18}$, assume-se que o teor de FDN no alimento retido em cada peneira do SPPS é constante. Outra metodologia plausível seria mensurar o teor de FDN em cada peneira do SPPS, obtendo assim a $peFDN_{>8-FDN}$ ou $peFDN_{>1,18-FDN}$ (ZEBELI et al., 2012). Mensurações de $peFDN_{>8}$ e $peFDN_{>1,18}$ são mais práticas e de menor custo que mensurações de $peFDN_{>8-FDN}$ e $peFDN_{>1,18-FDN}$, e por isto são adotadas por modelos nutricionais (AGRICULTURAL MODELING AND TRAINING SYSTEMS - AMTS, 2006), devido à maior aplicabilidade em rebanhos. Entretanto, não se sabe se a diferença nas formas de mensuração da peFDN, por análise do teor de FDN ou apenas da proporção da MS acima das peneiras do SPPS, tem significado prático, como forma de prever a capacidade

de uma dieta de evitar acidose ruminal (ALAMOUTI et al., 2009; EINARSON; PLAIZIER; WITTENBERG, 2004; YANG; BEAUCHEMIN, 2006; ZEBELI et al., 2008). Alternativamente, a distribuição de partículas do alimento com base na matéria natural também tem sido utilizada como medida de pef (CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM - CNCPS, 2001). Neste caso, assume-se que tanto o teor de MS quanto o de FDN são constantes nas peneiras do SPPS.

Zebeli et al. (2012) sugerem que a predição da resposta em pH ruminal a mudança no teor de peFDN da dieta é semelhante quando feita a partir do teor dietético de peFDN_{>8} ou de peFDN_{>1,18}. Entretanto, variáveis como atividade mastigatória e CMS foram preditas com maior exatidão pelo peFDN_{>8} que pelo FDN_{>1,18} (ZEBELI et al., 2010). Estes autores sugerem que o teor dietético de peFDN_{>8}, no qual não mais ocorreria aumento no pH ruminal, seria 18,5% da MS, ou 31,2% de peFDN_{>1,18}. Entretanto, os dados compilados por esses autores também sugerem que teores dietéticos de peFDN_{>8} acima de 14,9% da MS podem deprimir o CMS. Neste caso, estratégias nutricionais capazes de aumentar a densidade energética da dieta, mas sem a necessidade de aumentar o teor de peFDN ou valor capaz de deprimir o CMS, seriam interessantes para vacas de alta produção leiteira.

2.1.4 Tamanho de partículas e mat ruminal

A digesta do rúmen-retículo é um ambiente complexo e heterogêneo, composto por fases líquida e sólida. Na fase ventral, a digesta é mais fluida enquanto na dorsal existe uma camada de digesta pouco densa e que permanece flutuante. Essa camada flutuante é denominada mat ruminal (TAF AJ et al., 2004).

A estrutura do mat ruminal (espessura e densidade) é considerada um indicador de quão adequado é uma dieta em teor de peFDN (SUTHERLAND,

1988). A estrutura do mat determina o ambiente ruminal por afetar as atividades de ruminação, salivação e motilidade, determinantes do pH do fluido. O mat do rúmen também promove a retenção de partículas alimentares no ambiente ruminal, servindo como barreira física à passagem das partículas alimentares pelo orifício retículo-omasal, principalmente aquelas com tamanho de partícula suficientemente pequeno para deixar o rúmen por passagem com a digesta (POPPI et al., 2001). Allen (1997) sugere que a redução no tamanho de partícula das forragens pode aumentar o CMS, mas pode reduzir o tempo de retenção e a digestibilidade ruminal da dieta, por formação menos eficiente de mat. Por outro lado, o aumento no tamanho de partículas, desde que o CMS não seja afetado, pode aumentar o tempo de retenção da fase sólida e potencializar o processo fermentativo no rúmen.

Zebeli et al. (2007) avaliaram a função ruminal e as características do mat de vacas leiteiras suplementadas com feno de alfafa diferindo no TTP (6 ou 30 mm) em dietas com alto ou baixo teor de concentrados (20 ou 60% da MS). Em dietas com baixo teor de concentrado, o aumento do tamanho de partículas aumentou a atividade de ruminação, o volume da digesta ruminal e a consistência do mat, sem afetar a produção de ácidos graxos voláteis (AGVs), o pH e a taxa de passagem da digesta pelo rúmen. Em dietas de alto concentrado, o aumento no tamanho de partícula da forragem na dieta aumentou o tempo de ruminação, consistência do mat ruminal e taxa de passagem da fase sólida e diminuiu a capacidade fibrolítica da digesta. Os autores concluíram que as características do mat ruminal foram diretamente afetadas pelo tamanho de partícula da forragem, mas a digestibilidade pode ser comprometida quando as dietas com alto concentrado são formuladas para exceder os requisitos de peFDN.

2.1.5 Tamanho de partículas e a função ruminal

O ambiente ruminal é influenciado pelo tamanho de partícula da dieta. As dietas de vacas leiteiras de alta produção são normalmente ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen, com alta taxa de geração de AGVs e induzindo queda no pH ruminal (ASCHENBACH et al., 2011). Dietas com adequado tamanho de partículas contribuem para a manutenção de adequado ambiente ruminal por estimular a atividade mastigatória, aumentando o fluxo de saliva rica em tampões como o bicarbonato (BEAUCHEMIN, 2005). A maior secreção de tampões diminui a ocorrência e intensidade das quedas de pH ruminal, proporcionando maior estabilidade dos processos fisiológicos e metabólicos do rúmen. Além disso, o aumento da motilidade ruminal promovido pelo adequado teor de peFDN induz maior desaparecimento de AGVs do rúmen por passagem com a digesta e absorção pelo epitélio (MELO et al., 2013), contribuindo para manutenção do equilíbrio ácido-base do conteúdo do rúmen (ALLEN et al., 2006).

Kononoff, Heinrichs e Buckmaster (2003) avaliaram o efeito da redução do tamanho de partícula da silagem de milho sobre a ingestão, atividade mastigatória e fermentação ruminal em vacas leiteiras. Quatro vacas canuladas com 110 ± 4 dias em lactação foram usadas em delineamento do tipo quadrado latino com períodos de 14 dias. Os tratamentos foram: 1) silagem de milho com tamanho de partículas muito curtas (MC), curtas (C), longas (L) ou muito longas (ML). O tratamento C foi formado por duas partes da silagem de milho C e uma parte de ML. O tratamento L foi formado por duas partes de ML e uma parte de C. A dieta foi composta por 57% das silagens de milho como proporção da MS total. A proporção de partículas maior que 8 mm com base na MS das dietas foi: 59,5; 62,4; 64,3 e 65,8% para os tratamentos MC, C, L e ML, respectivamente. A redução no tamanho de partícula aumentou linearmente o CMS (28,0; 26,8; 26,8 e 25,7 kg/d para MC, C, L e ML respectivamente). O teor de FDN nas

sobras mensuradas as 8, 16 e 24 horas após a alimentação diminuiu linearmente com a redução do tamanho de partículas. A atividade mastigatória por kg de CMS diminuiu linearmente com a diminuição do tamanho de partícula. O pH não foi afetado pelos tratamentos, mas a concentração de ácidos graxos voláteis aumentou linearmente de 89,1 para 93,6 mM/L com a diminuição do tamanho de partícula da silagem de milho. Efeito quadrático foi observado na relação acetato/propionato com a maior relação observada nos tratamentos com tamanho de partícula intermediário. Os resultados desse experimento sugerem que a diminuição do tamanho de partícula afetou positivamente o CMS, a fermentação ruminal e reduziu a seleção de ingredientes da dieta.

Zebeli et al. (2008) avaliaram a atividade ruminal e o desempenho leiteiro de vacas alimentadas com dietas diferindo no tamanho de partícula da silagem de milho. Quatro vacas canuladas com produção de 38 ± 3 kg/d e 60 \pm 8 dias em lactação, foram alimentadas *ad libitum* com dietas contendo 16% de proteína bruta (PB) e 34% de FDN. As dietas continham 50% de concentrados, 10% de feno de gramínea e 40% de silagem de milho. Os TTPs utilizados durante a colheita da planta do milho foram: 14 mm (Longo), 8,1 mm (Médio) e 5,5 mm (Curto). A proporção de partículas maior que 8 mm foi 41,8; 35,1 e 25% e os teores de $\text{peFDN}_{>8}$ foram 21,7; 16,4 e 12,6% nos tratamentos Longo, Médio e Curto respectivamente. Os teores de $\text{peFDN}_{>1,18}$ foram calculados, mas pouca variação foi verificada entre os tratamentos ($28 \pm 0,6\%$). Os valores de $\text{peFDN}_{>8}$ e $\text{peFDN}_{>1,18}$ relatados neste trabalho foram corrigidos para sobras alimentares, o que torna esses valores de peFDN menores se comparados aos dados de outros experimentos (mensurados apenas na dieta oferecida). O CMS não foi afetado pelos tratamentos ($19 \pm 0,93$ kg/d). A diminuição no TP da silagem de milho reduziu a proporção de propionato (28,4; 27,2 e 23,8 mol/100 mol AGV nos tratamentos Longo, Médio e Curto respectivamente) e aumentou a relação entre acetato e propionato (2,0; 2,1 e 2,5 similarmente) no fluido ruminal. A queda na

proporção molar de propionato e aumento na relação entre acetato e propionato com menor TP foi um resultado inesperado, visto que o consumo de $\text{peFDN}_{>8}$ diminuiu com a diminuição do TP. Entretanto consumo de $\text{peFDN}_{>1.18}$ aumentou e o índice de seleção (sorting index) a favor de partículas menores 1.18 mm diminuiu linearmente com redução do TP. A digestibilidade da FDN no trato digestivo total foi maior no tratamento Médio (47,9% do ingerido) comparado ao Longo (43,8%) e Curto (44,6%) foi atribuída a maior atividade de enzimas fibrolíticas do rúmen no TP Médio (teste *in vitro* realizado durante o experimento). Os autores concluíram que redução moderada no TP da silagem de milho (representada pelo TTP de 8,1 mm e dieta com 35% das partículas acima de 8 mm) em dietas contendo 10% de feno de capim e 50% de concentrado, contribuiu para maximizar a atividade fibrolítica no rúmen e a digestibilidade de nutrientes, o que poderia afetar positivamente o desempenho de vacas leiteiras.

2.1.6 Tamanho de partículas e fermentabilidade da dieta

A pesquisa tem demonstrado que existe relacionamento entre a exigência de TP e o tipo de grãos da dieta (FIRKINS et al., 2001; HERRERA-SALDANA; HUBER; POORE, 1990; HUNTINGTON, 1997; TAJAJ et al., 2004; YANG; BEAUCHEMIN, 2005). Essa relação parece estar associada com as diferenças na quantidade e estrutura do amido nas diferentes fontes, afetando a magnitude de degradação no rúmen. O potencial acidogênico de grãos como o milho, aveia e trigo são diferentes e conseqüentemente a exigência de peFDN na dieta. A composição e a concentração da matriz proteica presente no endosperma dos diferentes tipos de grãos são grandes determinantes da variação na degradabilidade ruminal do amido dentro e entre fontes (THEURER, 1986). A proporção entre amilose e amilopectina, maturidade fisiológica, textura, e grau de processamento da fração amido também afetam a capacidade

fermentativa de diferentes fontes de grãos de cereais (AMETAJ et al., 2010; JOHNSON et al., 1999; PEREIRA et al., 2004; TAJAJ et al., 2006).

O fornecimento de grãos diferindo na taxa de degradação do amido no rúmen pode ser uma estratégia para modulação da fermentação ruminal. Maulfair e Heinrichs (2013) estudaram o efeito da variação do TP da silagem de milho e dois graus de processamento de grãos sobre o desempenho e o ambiente ruminal de vacas leiteiras. O delineamento experimental foi do tipo quadrado latino 4 x 4, com períodos de 21 dias em arranjo fatorial 2 x 2 de tratamentos. Foram utilizadas 12 vacas canuladas no rúmen produzindo 43,5 kg/d. O milho de planta inteira foi colhido com TTP de 47 mm e abertura de 6,35 mm entre os rolos do sistema de processamento dos grãos. O TTP da silagem curta foi produzido por repicagem da silagem longa imediatamente antes da alimentação com ensiladora estacionária. As dietas continham 42% de silagem de milho e 15,4 % de pré-secado de alfafa. As dietas geradas foram: silagem de milho com partículas longas (L) e curtas (C), combinadas com milho laminado (C) ou finamente moído (F). A proporção de partículas acima de 8 mm, como porcentagem da matéria natural, foi de 43,4; 37,5; 23,9 e 21,1% para as dietas LC, LF, CC e CF respectivamente. Em dietas com TTP L, o consumo foi maior com milho F (LF), comparado ao milho C (LC) e não foi alterado em dietas com TTP C (CC e CF). A produção de leite não foi afetada pelo TTP, mas as produções de leite e proteína do leite foram 3,2 e 0,1 kg/d maiores nas dietas com milho fino comparado ao laminado tanto em TTP L quanto C. A atividade mastigatória em min/d foi maior nas dietas LC e LF, comparada com as dietas CC e CF, sendo determinada por incrementos no tempo de ruminação sem afetar o tempo de ingestão. A seleção de ingredientes varia ao longo do dia e seu efeito foi verificado em todas as dietas, sendo esse efeito mais pronunciado nas dietas com maior TTP (LC LF). O valor de pH ruminal médio e máximo tendeu a ser maior nas dietas com maior TTP, e o tempo diário de pH menor que 5,8 tendeu a

ser maior nas dietas com menor TTP. Os resultados sugerem que a produção de leite e o CMS podem ser afetados pela alteração no grau de fermentabilidade na dieta e esse efeito é influenciado pelo TTP da dieta.

Nasrollahi et al. (2012) avaliaram a influência da fermentabilidade dos grãos e do TTP do feno de alfafa sobre a fermentação ruminal, a digestibilidade e o desempenho de vacas leiteiras no terço médio da lactação. Oito vacas (175 dias em lactação) foram alocadas em delineamento do tipo quadrado latino 4 x 4, com períodos de 21 dias. Os tratamentos foram um arranjo fatorial 2 x 2 de dois TTP teóricos do feno de alfafa (15 mm ou 30 mm) combinado com duas fontes de grãos de cereais (100% de grãos de cevada ou 50% de cevada e 50% de milho moído). As vacas consumindo cevada e milho tiveram maior CMS e digestibilidade aparente da FDN no trato digestivo total que as vacas consumindo apenas cevada. As dietas contendo apenas cevada tiveram maior digestibilidade dos carboidratos não fibrosos (CNF), e esse efeito foi mais pronunciado na dieta contendo feno de alfafa colhido com TTP de 30 mm. A dieta com feno de alfafa colhido com 30 mm aumentou o tempo de ingestão e o pH ruminal, e tendeu a aumentar a relação entre acetato propionato no rúmen. Os resultados indicaram que o aumento no TTP do feno de alfafa pode aumentar o tempo de ingestão e melhorar o perfil de fermentação ruminal, principalmente em dietas à base de cevada. A substituição parcial do grão de cevada pelo milho aumentou o CMS e digestibilidade da FDN.

2.1.7 Tamanho de partículas e desempenho de vacas leiteiras

A literatura sobre a influência do TTP da forragem sobre a produção de leite apresenta resultados bastante variáveis (ALAMOUTI et al., 2009; YANG; BEAUCHEMIN, 2007). Nos trabalhos com resposta positiva em volume de leite à menor TTP, a resposta ocorre normalmente associada ao aumento do CMS

(ALAMOUTI et al., 2009; FERRARETTO; SHAVER, 2012a; TEIMOURI YANSARI et al., 2004).

Yang e Beauchemin (2006) avaliaram o efeito da variação do TTP de dietas contendo silagem de milho como única forragem sobre a ingestão, mastigação, pH ruminal, síntese de proteína microbiana, digestibilidade e produção de leite. No mesmo experimento, os autores avaliaram a efetividade de métodos de mensuração do peFDN para formulação de dietas. Os teores de peFDN (maior que 8 e 1.18 mm) foram calculados de duas formas. A primeira foi obtida multiplicando o teor de MS em cada peneira pelo teor de FDN total da amostra (proporção de MS retida em cada peneira x FDN da amostra total) obtendo-se o $peFDN_{>8}$ ou $peFDN_{>1.18}$ e a segunda forma pela mensuração do teor de FDN em cada peneira (proporção de MS retida em cada peneira x teor FDN em cada peneira) obtendo-se o $peFDN_{>8-FDN}$ e $peFDN_{>1.18-FDN}$. O delineamento foi em quadrado latino 3×3 , utilizando seis vacas canuladas com 120 ± 63 dias em lactação. O milho planta inteira foi colhido com 40% de MS. A abertura entre os processadores de grãos da colhedora automotriz foi de 2 mm e os TTPs foram: 28,6 mm (LONGO), 15,9 mm (MÉDIO) e 4,8 mm (CURTO). As proporções de partículas (% da MS) acima de 8 mm das dietas foram: 55,5, 48,5 e 32,2 para as dietas LONGO, MÉDIO E CURTO respectivamente. Os teores de $peFDN_{>8mm}$ e $peFDN_{>1.18}$ das dietas foram: 22,2 e 34,1% (LONGO); 18,8 e 32,3% (MÉDIO); 11,9 e 32,4% (CURTO). Não foi detectado efeito de tratamentos sobre o CMS (24 ± 1 kg/d). A produção de leite foi 1,1 kg/d maior no tratamento MÉDIO comparado ao CURTO (32,1 vs. 31,0 kg/d = 0,04). A eficiência de crescimento microbiano (g/kg de matéria orgânica ingerida) e a secreção de alantoína na urina (mmoles/d) foram 32% e 12% maiores para o tratamento com TTP MÉDIO. A digestibilidade da FDN no trato digestivo total tendeu a aumentar de forma linear com o aumento do TTP. Houve aumento linear nos tempos diários de ruminação e mastigação com aumento no teor de

peFDN_{>8} da dieta ($P < 0,01$), enquanto houve apenas tendência de aumento em resposta ao teor de peFDN_{>1,18} ($P = 0,14$). Os autores concluem que o aumento do TTP da silagem de milho proporcionou aumento no teor de peFDN, afetando positivamente o desempenho e saúde ruminal de vacas leiteiras. Além disso, a utilização do SPPS com apenas duas peneiras (19 e 8 mm) descreve de forma suficiente o potencial da dieta em estimular a atividade mastigatória.

Yang e Beauchemin (2007b) avaliaram o efeito da variação da ingestão de FDN fisicamente efetivo sobre a digestibilidade e a produção de leite. Os tratamentos foram formados por variação no teor dietético de silagem de alfafa (35 ou 60% da MS da dieta) diferindo no TTP (7,9 ou 19,1 mm). O teor de peFDN_{>8} foi determinado a partir da soma da proporção na MS da dieta retida nas peneiras de 8 e 19 mm SPPS ou nas peneiras de 1,18, 8 e 19 mm, multiplicado pelo teor de FDN da dieta. Os teores de peFDN_{>8} das dietas com TTP curto e longo foram de 11,7 e 19,8 (% da MS da dieta) respectivamente. O maior teor de forragem deprimiu em 9% o CMS e 46% de amido em 46%, mas aumentou o consumo de FDN em 53%. A digestibilidade da MS no trato digestivo total não foi afetada, enquanto a digestibilidade da FDN foi maior na dieta com mais forragem. A dieta de baixa forragem deprimiu o desempenho leiteiro, mas a produção de leite corrigida para 4% de gordura foi semelhante. Variação no TTP da forragem não afetou a produção de leite dos animais. O aumento no teor de peFDN de dietas baseadas em silagem de alfafa de 11,7 para 19,8% da MS teve efeito positivo sobre a digestibilidade da FDN, mas não determinou o desempenho leiteiro.

Ferraretto e Shaver (2012a) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo silagem de milho colhida com sistema Shredlage (SHRD; Shredlage LLC, Oskaloosa, EUA) ou colhida de forma convencional (KPCS). A silagem KPCS foi colhida com sistema de processadores de grãos convencionais com abertura de 3 mm e TTP de 19 mm. A silagem

SHRD foi colhida utilizando um processador com ranhuras nos rolos e com abertura de 2,5 mm e configurado para TTP de 30 mm. Cento e doze vacas formaram grupos de 14 animais com base nos dias em lactação, produção de leite e paridade e foram distribuídas aleatoriamente em 14 baias com oito vacas por baia. Cada baia recebeu um tratamento por oito semanas, após um período de padronização de duas semanas (total de 10 semanas). As dietas experimentais continham 50% de silagem de milho (KPCS ou SHRD), 10% de silagem de alfafa e 40% de alimentos concentrados. A silagem SHRD tendeu a aumentar o CMS (0,7 kg/d) e a produção de LCG (1,0 kg/d). Houve interação entre tratamento e semana para a variável produção de LCG, maior nas semanas quatro, seis e oito no tratamento SHRD. A degradação ruminal *in situ* do amido foi maior para a silagem SHRD.

Nasrollahi, Imani e Zebeli (2015) conduziram uma meta-análise para avaliar o efeito do TTP da forragem sobre o consumo de nutrientes, a digestibilidade da MS e a produção de leite. Os dados foram oriundos de 45 artigos e 95 experimentos (após exclusão de todos os trabalhos que não continham informações necessárias) publicados entre 1998 e 2014. Os consumos de MS e FDN aumentaram com redução no TTP da forragem (0,527 e 0,166 kg/d respectivamente), mas a digestibilidade do FDN caiu 0,6% com aumento TTP. Entretanto, maior CMS em resposta à menor TP da forragem ocorreu apenas quando as dietas continham mais de 50% de silagem na MS. A digestibilidade FDN foi maior quanto menor foi o TP de feno. O menor TTP aumentou as produções de leite e proteína (0,541 e 0,02 kg/d respectivamente) e reduziu o teor de gordura do leite, resultando em volume similar de LCG. Estes dados sugerem que a atuação sobre o TP da forragem pode determinar o CMS e produção de leite, mas os efeitos dependem do tipo de forragem e teor na dieta.

2.1.8 Tamanho de partículas e processamento de grãos da silagem de milho

A forragem de milho é composta da fração colmo, rica em FDN, e da fração grãos, rica em amido. Os grãos de milho contêm 72% de amido (HUNTINGTON, 1997) e representam cerca de 45% da MS planta inteira (PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1998) e mais do que 50% da energia na planta (NRC, 2001). O processamento da silagem tem por objetivo manter adequado o TP da fração vegetativa e o máximo processamento da fração grãos. A digestibilidade no trato digestivo total do amido pode variar de 80 a 98% em vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de silagem de milho (FERRARETTO; SHAVER, 2012b). O processamento da silagem de milho durante a colheita com máquina automotriz equipada com sistema de rolos esmagadores (“corn crackers”) reduz o TP dos grãos e aumenta a digestibilidade do amido (BAL et al., 2000; COOKE; BERNARD, 2005; JOHNSON et al., 2002). No entanto, a eficiência do processamento da fração grãos é variável e pode ser influenciada por vários fatores, como maturidade ou teor de MS no momento da colheita, textura dos grãos, regulagem visando TP do equipamento, e tipo e ajuste dos processadores (FERRARETTO; SHAVER, 2012b; SHINNERS et al., 2000). Portanto, métodos para avaliar o grau de processamento dos grãos na silagem de milho têm uso rotineiro na formulação de dietas.

A textura do grão de milho também exerce impacto sobre a digestibilidade do amido e desempenho de vacas leiteiras (JOHNSON et al., 2002). Grãos de milho usados para alimentação animal normalmente contêm ambos: endosperma duro e endosperma farináceo. O milho do tipo duro tem a maior proporção do endosperma do tipo vítreo (PHILIPPEAU; MONREDON; MICHALETDOREAU, 1999). O endosperma mais vítreo possui uma coloração amarelo-escuro localizada na porção mais externa do grão comparado ao milho considerado farináceo. Nesse local, o amido é altamente vítreo e compactado e

contém células com formatos poligonais, envoltos em uma densa matriz proteica (PEREIRA et al., 2004). O aumento da vitreosidade dos grãos de milho é associado com a diminuição da degradação ruminal do amido (CORREA et al., 2002). No Brasil, 81% das sementes comercializadas para silagem são híbridas de textura dura e semidura. De acordo com Millen et al. (2009) 79,3% dos produtores de leite do Brasil utilizam o milho como fonte energética e 90,9% deste milho é do tipo duro ou cristalino.

O grau de processamento da fração grãos na ocasião da colheita também pode afetar diretamente a digestibilidade da fração de carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen, por expor os grânulos de amido à digestão (PHILIPPEAU; MICHALET-DOUREAU, 1998). McAllister et al. (1990) avaliaram a fragmentação de grãos de milho em diferentes tamanhos de partículas e concluíram que grãos inteiros só foram colonizados em regiões onde havia alguma fratura no pericarpo, indicando que a fratura do pericarpo é necessária para permitir o acesso das bactérias aos nutrientes rapidamente digestíveis do grão. Em grãos partidos em duas ou quatro partes enquanto o endosperma farináceo foi amplamente colonizado por diversas bactérias, o endosperma vítreo apresentou apenas pequenos sinais de digestão. Ao exame por microscopia, essa região apresentava apenas colonização esparsa pelas bactérias ruminais.

Atualmente existem vários tipos de sistemas operacionais para colheita e produção de silagens com grande variabilidade de eficiência e desempenho. O primeiro sistema é composto por colhedoras simples (1, 2 ou 3 linhas de corte) e o segundo são máquinas automotrizes (4 a 12 linhas de corte). Grande parte dos produtores de leite do país utiliza máquinas com até duas linhas de corte, sem processador de grãos (BERNARDES; RÊGO, 2015). Esses equipamentos apresentam baixo custo de aquisição e utilização, coerentes à baixa escala de produção das fazendas leiteiras e à topografia muitas vezes acidentada das áreas

de cultivo. Neste tipo de colhedora, o dano de grãos é normalmente obtido por redução no TTP durante a colheita. Quanto menor o TTP, maior é o potencial de dano aos grãos e, conseqüentemente, maior o grau de acesso microbiano e enzimático ao amido no rúmen (HOFFMAN et al., 2012). Essa é uma estratégia muito utilizada e particularmente importante no Brasil, onde o milho cultivado tem endosperma duro, de baixa digestibilidade (CORREA et al., 2002). Entretanto, a redução no TP suficiente para aumentar o dano aos grãos pode afetar negativamente a função ruminal e aumentar a propensão de acidose ruminal. Máquinas do tipo automotriz possibilitam ajuste do TP, mantendo o processamento dos grãos, uma vez que possuem sistema de processamento da fração grãos realizados por rolos esmagadores que podem ser regulados com abertura entre 1,0 a 6 mm, realizando a prensagem da forragem colhida, esmagando os grãos e mantendo o TP da fração colmo (JOHNSON et al., 1999). O uso de máquinas automotriz no Brasil tem se tornado uma prática cada vez mais comum, principalmente devido à necessidade de eficiência da utilização de grãos, janela de corte relativamente curta das cultivares de milho e a crescente necessidade de fibra longa como forma preventiva de evitar a acidose ruminal. Entretanto, o uso desse tipo de máquinas ainda é restrito (BERNARDES; RÊGO, 2015).

De acordo com Bal et al. (2000), o processamento da fração grãos da silagem de milho pode afetar positivamente o consumo e a produção de leite. O TTP de 9,5 mm sem a utilização de sistema de processamento de grãos e os tratamentos testados: silagem de milho com TTP de 9,5; 14,5 ou 19 mm com o sistema de processamento ajustado para um milímetro de distância entre os rolos esmagadores. A dieta foi composta de 50% de forragem (67% de silagem de milho e 33% de silagem de alfafa) e 50% de concentrado à base de milho e farelo de soja (% MS). A utilização do processador aumentou o CMS (25,9 vs. 25,3 kg de MS/dia), a produção de leite (46,0 vs. 44,8 kg/dia) e a produção de

gordura (1.42 vs. 1.35 kg/d) nos tratamentos com processamento, comparado ao tratamento controle sem processamento. A atividade mastigatória não foi diferente ao longo dos tratamentos (12 h/d). Entretanto, a consistência do mat ruminal foi maior no TTP 19,5 com processamento comparado aos demais tratamentos. A digestibilidade do amido no trato digestivo total foi maior nos tratamentos com processador (99,3%) comparada ao tratamento controle sem processamento (95,1%). A digestibilidade do FDN no trato digestivo total ao longo dos tratamentos com processador foi reduzida em menor TTP (28%) comparado aos demais (33,9 a 33,7%). O processamento do milho (planta inteira) com 35% de matéria seca aumentou a produção de leite e esse resultado foi atribuído ao maior CMS e maior digestibilidade do amido. O TTP 19 mm foi mais eficiente em manter a consistência do mat ruminal e digestibilidade do amido sem comprometimento na digestão de FDN.

Cooke e Bernard (2005) avaliaram os efeitos do comprimento teórico de corte (TP) e o processamento de grãos (PG) de silagem de planta inteira de milho sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite de vacas leiteiras. As vacas em terço médio de lactação (144 ± 45 dias em lactação e produção média de 34 ± 6 kg/d) foram aleatoriamente alocadas em delineamento do tipo blocos casualizados com duração de 56 dias. As dietas foram compostas de 38% de silagem de milho, 6% de feno de alfafa e 56% de uma mistura de concentrados (% da MS). Nesse trabalho foram testados dois TTP da silagem de milho (19,5 e 25,4 mm) e duas regulagens do processador de grãos (distância entre os rolos esmagadores de 2 e 8 mm). O tratamento controle foi silagem de milho colhida com TTP de 19,5 mm sem processador de grãos. Houve interação significativa entre o TTP e a regulagem do processador de grãos. Contrastes ortogonais foram utilizados para comparar os tratamentos. A digestibilidade da MS foi maior para os tratamentos com TTP de 25,4 comparado ao corte com 19,5 mm (56 vs. 51,9%). A digestibilidade do amido

foi maior quando o processador de grãos foi regulado com 2 mm comparado aos tratamentos com 8 mm (85,4 vs. 75,5%), assim como, a produção de leite (37,1 vs. 35 kg/d) e a eficiência alimentar (1,74 vs. 1,54). A produção de gordura foi maior no TP 25,4 e processador com 2 mm comparado ao TP 19,5 mm e processador com 8 mm (1,5 vs. 1,29 kg/d). Os autores concluíram que o aumento do TP associado ao uso do processador com 2 mm aumentou o desempenho de vacas leiteiras.

O estágio de maturidade dos grãos também pode influenciar a capacidade de dano aos grãos durante o corte e ensilagem. O corte para ensilagem de maneira precoce, quando os teores de MS ainda são inferiores a 30%, implica em plantas cujos grãos não possuem quantidades relevantes de amido e o teor de água é relativamente alto, causando perdas por efluentes. Silagens feitas em estádios mais tardios, acima de 40% de MS, possuem menor digestibilidade da MS, baixa capacidade fermentativa, menor grau de compactação e maiores perdas de MS. De acordo com Bal e Shaver (1997), o impacto do processamento da silagem de milho com teores de MS inferiores a 30% pode ser baixo, considerando que a digestibilidade da MS nesse ponto é relativamente alta. Estudos realizados por Johnson et al. (1999), demonstraram que o processamento da silagem de milho é intensamente afetado pelo teor de MS da planta. Silagem de milho em estádios avançados de maturidade e com processamento da fração grãos, obteve maior degradação ruminal da MS, quando comparada ao controle sem processamento de grãos. O que sugere que o processamento aumentou a proporção de grãos danificados na silagem, aumentando a capacidade de degradação por ação dos microrganismos ruminais, afetando positivamente o desempenho de vacas leiteiras.

Ferraretto e Shaver (2012b) realizaram uma meta-análise para determinar os efeitos do teor de MS, processamento de grãos e TP da silagem de milho de planta inteira sobre o consumo, digestão e o desempenho de vacas

leiteiras utilizando um conjunto de dados composto por 106 tratamentos a partir de 24 artigos em periódicos com revisão entre 2000 e 2011. As categorias de teor de MS na abertura do silo foram: menor que 28%, entre 28 e 32%, entre 32 e 36%, entre 36 e 40%, e maior que 40% de MS. A abertura dos rolos esmagadores definiram os tratamentos como grãos processados (abertura dos rolos entre 1 e 3 mm) e não processados (abertura dos rolos com mais de 4 mm). Os tamanhos de partícula na planta foram classificados: entre 4,8 a 6,4 mm; 9,3 a 11,1 mm; 12,7 a 15,9 mm; 19,0 a 19,5 mm; 25,4 a 28,6 mm e maior que 32,0 mm. A produção de leite foi reduzida em 2 kg/d quando o teor de MS foi superior a 40% e a produção de leite corrigida para 4% quando a gordura diminuiu, principalmente quando o teor de MS da silagem de milho foi superior a 40%. Os tratamentos com silagem de milho considerada processada (com abertura dos processadores entre 1 e 3 mm) aumentaram a digestibilidade no trato digestivo total do amido em comparação com as silagens não processadas (4-8 mm) e a produção de leite tendeu a ser maior em 1,8 kg/vaca. Os diferentes tamanhos de partícula não afetaram o desempenho animal. De forma geral, a digestibilidade do amido e a produção de leite foram majoritariamente afetadas quando o teor de MS da silagem foi superior a 40%.

A disponibilidade de métodos para avaliação da eficiência de processamento da fração grãos da silagem de milho ainda é limitada. O momento mais adequado para avaliar o processamento de grãos é durante a colheita, considerando que ajustes e correções ainda são possíveis de serem realizados. Ferreira e Mertens (2005) estabeleceram uma metodologia para determinar o grau de processamento dos grãos na silagem de milho, definido como Corn Silage Processing Score (CSPS) ou Kernel Processing Score (KPS). Nessa metodologia, a proporção de amido que passa através de uma peneira com crivos de 4,75 mm é determinada, após a separação vertical de amostras previamente secas em estufa. A silagem é considerada como de excelente

processamento, quando a porcentagem de amido sobrepassante da peneira de 4,75 mm é maior do que 75% e considerada como de baixo grau de processamento quando a quantidade de amido que passou pela peneira de 4,75 mm é inferior a 50%.

Zwald et al. (2008) avaliaram a predição do tamanho de partículas do amido contido na fração grãos da silagem de milho pela técnica de NIRS (Near-Infrared Reflectance Spectroscopy). Foram utilizadas 81 amostras de silagem de milho, diferindo em tipo de híbridos, época de plantio e grau de processamento da fração grãos com o intuito de abranger a diversidade de condições em nível de sistemas de produção. O CSPS, o diâmetro geométrico médio (DGM) e a área de superfície (AS) foram determinados em cada amostra e utilizados como padrão das características físicas das partículas de amido de cada amostra. As amostras foram escaneadas pelo NIRS por três formas diferentes: a) silagem de milho seca e moída a 1 mm; b) silagem de milho integral, sem secagem e moagem e c) silagem sem a fração > 19 mm, sem moagem e desidratação. O relacionamento entre os resultados obtidos pelo NIRS e o CSPS, DGM e AS das amostras secas e moídas, assim como, das amostras integrais (sem moagem e desidratação) foram baixos ($R^2 < 0,45$). Entretanto, o relacionamento entre o escaneamento obtido pelo NIRS e as variáveis CSPS, DGM e AS, utilizando as amostras integrais sem a fração > 19 mm foi alto ($R^2 > 0,81$). Os autores concluem que a técnica pode ser promissora na avaliação do tamanho de partículas do amido da silagem de milho pela rapidez de obtenção dos resultados, praticidade e eficiência do método.

2.2 Enzimas fibrolíticas

Em sistemas de produção de leite, a alimentação do rebanho pode representar de 40 a 60% do custo total (BAILEY, 2009). As forragens representam em torno de 40 a 60% da dieta do gado leiteiro em sistemas de

confinamento total (BARNES; NELSON, 2003). Entretanto, as fontes forrageiras utilizadas na alimentação animal são na maioria representadas por gramíneas tropicais, caracterizadas por possuírem médio a alto teor de fibras e relativa baixa digestibilidade. As forragens com fibras com baixa digestibilidade limitam a ingestão potencial de MS (JUNG; ALLEN, 1995), podendo afetar negativamente a produtividade animal (HANNA; SOLLENBERGER, 2007). Portanto, a melhoria da qualidade (valor nutritivo) de gramíneas pode exercer grande impacto sobre a rentabilidade na maioria dos sistemas de produção de ruminantes.

Dependendo do estágio de maturidade da planta, a parede celular pode representar entre 30 e 80% de MS da planta (BEAUCHEMIN; HOLTSHAUSEN, 2010). Ao longo das últimas décadas, vários trabalhos vêm sendo feitos buscando melhorar a qualidade da forragem através do aumento da digestibilidade da fração fibrosa da planta, seja pelo melhoramento genético ou através de tratamentos químicos ou biológicos.

As enzimas fibrolíticas podem atuar sobre a hidrólise da fibra (COLOMBATTO et al., 2003a), podendo afetar positivamente a digestibilidade da planta (BEAUCHEMIN; HOLTSHAUSEN, 2010) e CMS (PINOS-RODRIGUEZ et al., 2002). Entretanto, o mecanismo de ação das enzimas ainda não foi completamente esclarecido (ADESOGAN et al., 2014). Além disso, os trabalhos demonstram resultados inconsistentes sobre o desempenho animal. Essa variação nos dados pode ser atribuída a vários fatores, como dose da enzima e composição do produto comercial (EUN; BEAUCHEMIN, 2007), pH e temperatura ótimos de ação enzimática (ARRIOLA; ROMERO; ADESOGAN, 2011), nível de produção de leite dos animais estudados (SCHINGOETHE; STEGEMAN; TREACHER, 1999), delineamento experimental utilizado (ADESOGAN et al., 2014) tipo de ingrediente e composição da dieta na qual a enzima é aplicada (DEAN et al., 2013; KRUEGER; ADESOGAN, 2008).

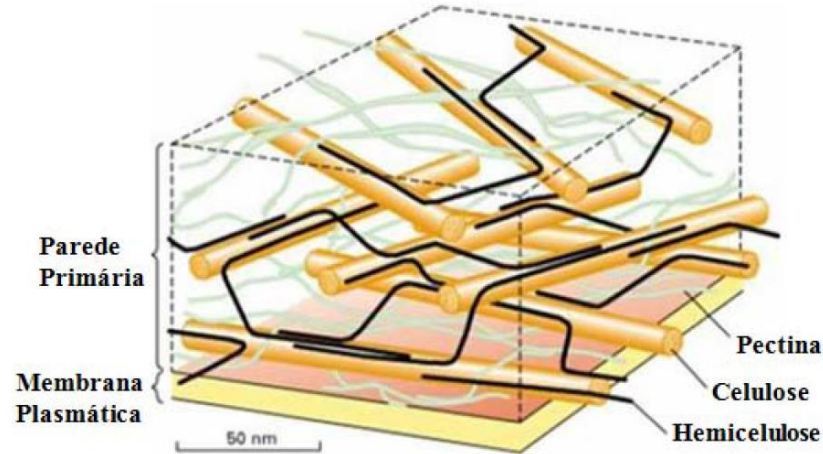
Portanto, estudos realizados sob condições padronizadas e bem descritas podem favorecer a compreensão dos mecanismos de ação e particularidades das enzimas, assim como, quantificar o nível de resposta em desempenho animal.

2.3 Constituição da parede celular da planta

A anatomia e a composição química da planta interferem na digestibilidade da planta e podem afetar o consumo voluntário pelos animais (COLEMAN; MOORE; WILSON, 2004). Vários estudos têm sido realizados para melhor entender os efeitos da composição química das plantas na ingestão, digestão e desempenho de vacas leiteiras. As mudanças advindas com a maturidade e os efeitos do ambiente sobre a planta podem afetar a digestibilidade (AKIN, 1989), mastigação e tempo de ruminação (COLEMAN; MOORE; WILSON, 2004), redução do TP (WILSON; KENNEDY, 1996) e taxa de passagem ruminal (KENNEDY; DOYLE, 1993).

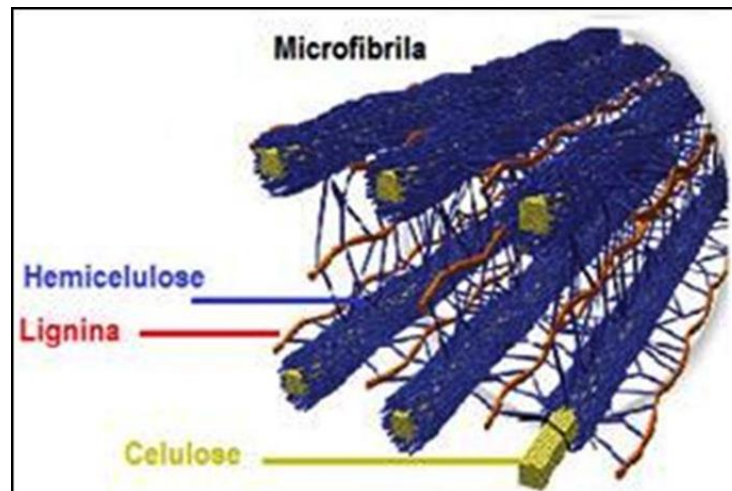
A parede celular da planta é um compartimento metabolicamente ativo, dinâmico, com funções específicas e essenciais, tais como a absorção, transporte e secreção de substâncias para além do seu papel na defesa contra patógenos de bactérias e fungos (EVERT, 2006). Ela é principalmente constituída por polissacáridos estruturais (celulose e hemicelulose), pectina e compostos fenólicos como a lignina (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** e 2).

Figura 1 - Representação esquemática da parede celular dos vegetais.



Fonte: Lodish et al. (2000).

Figura 2 - Estrutura da parede celular vegetal.

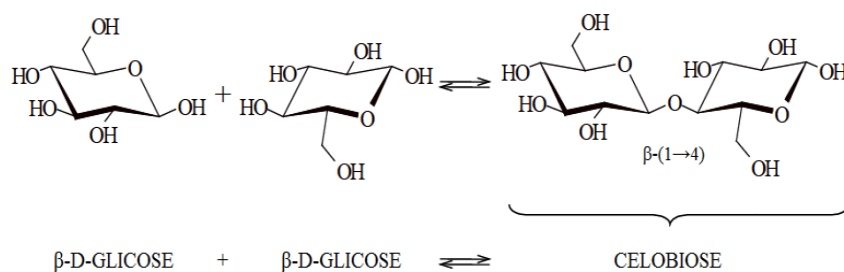


Fonte: Hatfield et al. (2007).

Outros componentes como proteínas, sais minerais e lipídeos também são encontrados em menores proporções (THEANDER; WESTERLUND, 1993). A celulose representa aproximadamente 40% de toda reserva de carbono

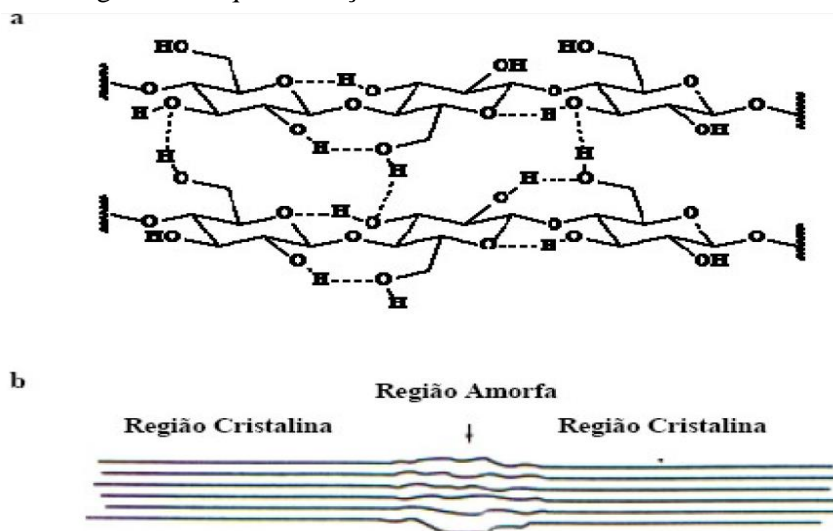
disponível na biosfera. Ela está presente em todas as plantas, desde árvores altamente desenvolvidas até em organismos mais primitivos e seu conteúdo nessas espécies varia de 20 a 99% (RABELO, 2007). É um homopolissacarídeo, constituído por unidades de anidroglicopiranosose (β -D-glicopiranosose), ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1-4) formando cadeia linear. Essas unidades de glicopiranosose formam uma ligação glicosídica através da eliminação de uma molécula de água, que envolve os grupos hidroxílicos dos carbonos 1 e 4 (FIGURAS 3 e 4).

Figura 3 - Formação da ligação celobiose, através da ligação glicosídica entre duas unidades de β -D-glicose.



Fonte: Martins (2005).

Figura 4 - Esquemática da estrutura da fibra de celulose.



Fonte: Lodish et al. (2000).

Esta estrutura dissacarídica recebe o nome de celobiose. A celobiose é definida como unidade conformacional mínima da celulose, enquanto a glicose representa a unidade fundamental das cadeias do homopolímero. As ligações do tipo β (1-4) presentes na molécula de celulose são de difícil hidrólise, apenas alguns seres, como fungos e bactérias, são capazes de tal função. Moléculas de celulose individuais são extremamente grandes (aproximadamente 15.000 unidades de glucopiranosose em algodão) e estão dispostas em feixes conhecidos como microfibrilas. A celulose apresenta regiões altamente ordenadas (regiões cristalinas), estabilizadas por numerosas pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, e áreas menos ordenadas ou amorfas, onde as cadeias apresentam orientações difusas (Figura 4). Vários autores sugerem que a celulose amorfa é mais suscetível à hidrólise enzimática do que a forma ordenada ou cristalina (BHAT; HAZLEWOOD, 2001), devido a sua maior área superficial. Com a associação dos diferentes tipos de polímeros que compõem a fibra vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), o grau de cristalinidade e o

empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina, obtém-se um material de estrutura rígida e muito resistente ao ataque enzimático. Dessa forma, a degradação da celulose na natureza ocorre lentamente a partir das extremidades susceptíveis. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm demonstrado ser capazes de catalisar a hidrólise da celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares de baixa massa molecular como a glicose e celobiose (MARTINS, 2005).

A hemicelulose é o segundo polissacarídeo mais comum na natureza e está sempre associada à celulose (Figura 2). O teor de hemicelulose em diferentes tipos de vegetais varia entre 20 e 30% (HATFIELD et al., 2007). Esses polissacarídeos se referem a uma mistura de polímeros de hexoses, pentoses e ácidos urônicos, que podem ser lineares ou ramificados, amorfos, e com peso molecular relativamente baixo. Podem receber diferentes denominações, como por exemplo, xilanas, mananas, arabinanas, dentre outras, conforme a composição e predominância de monossacarídeos (HATFIELD et al., 2007). O principal polissacarídeo componente da hemicelulose é a xilana, que está presente em todas as camadas da parede celular vegetal, na interface entre a celulose e a lignina. A hemicelulose é uma molécula heterogênea que consiste de cadeia principal de polixiloses com ligações β (1-4), podendo também conter ramificações de arabinose, manose, galactose e glicose. O grau de polimerização das hemiceluloses não ultrapassa o valor médio de 200 unidades de anidroaçúcares, portanto, bastante inferior ao da celulose.

Durante a construção da estrutura das hemiceluloses, os sacarídeos são depositados de forma intercalada nas microfibrilas de celulose em um estágio anterior à lignificação, dando elasticidade e flexibilidade ao agregado e impedindo agregação direta entre as microfibrilas de celulose (MARTINS, 2005). Além de se ligarem às superfícies das microfibrilas de celulose, as hemiceluloses também se ligam firmemente entre si, mantendo ligações

cruzadas através de pontes de hidrogênio, em uma rede complexa (WEIMER et al., 2000).

Em gramíneas, o principal açúcar da hemicelulose é o arabinoxilano, com a cadeia principal composta por ligações 1,4 entre xilose ou outros monômeros como arabinose, ácido glucurônico e ácido acético. O tipo e a frequência dos açúcares presentes variam com a espécie e fase de desenvolvimento. Por exemplo, fibra de milho contém 48-54% de xilose, 33-35% de arabinose, 5-11% de galactose, e 3-6% de ácido glucurônico (HATFIELD et al., 2007). Os arabinoxilanos podem formar ligações de hidrogênio com a celulose e vice-versa, mas estas ligações não inibem a taxa de digestão de ambos os polissacarídeos no fluido ruminal (WEIMER et al., 2000).

A lignina é o termo genérico para um grande grupo de polímeros aromáticos resultantes da combinação entre 4-hidroxi-phenil-propanoides. É uma substância que vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**2). Apresenta-se como um composto heterogêneo, de alto peso molecular, de estrutura irregular, altamente insolúvel e recalcitrante (WEIMER et al., 2000). Os precursores primários de lignina são álcoois coniferílico, sinafílico e cumarínico, que são polimerizados por ação de enzimas desidrogenases formando a cadeia da lignina. Geralmente, as ligninas são classificadas como guaiacilas (formados predominantemente a partir de álcool coniferílico), guaiacil-siringilas (derivados de coniferílico e sinafílico) ou lenhinas guaiacil-siringil-p-hidroxifenil ligninas (formados a partir de todos os três monômeros). As funções biológicas da lignina na planta são: a) fornecer suporte estrutural à parede secundária de plantas vasculares. A parede celular lignificada pode ser vista como um complexo, com microfibrilas de celulose e hemicelulose, e a lignina como uma “matriz plástica” conferindo resistência ao

material lignocelulósico; b) tornar a parede celular vegetal hidrofóbica, permitindo o desenvolvimento eficiente dos tecidos para transporte de água em plantas vasculares; c) conferir resistência ao ataque de pragas e doenças.

Do ponto de vista nutricional, a lignina é o maior fator limitante da digestão da parede celular vegetal para ruminantes (SOEST, 1994). A importância da lignina na digestibilidade das forragens se deve a sua capacidade de atuar como uma barreira física à digestão da parede celular. Além disso, a lignina é um material hidrofóbico que substitui a água na parede da célula (EVERT, 2006). O ambiente ruminal, pelo seu caráter anaeróbio, impede a digestão da lignina pelos microrganismos do rúmen (HATFIELD et al., 2007).

A pectina é um componente importante da parede celular primária das plantas. O conteúdo de pectinas decresce da parede celular primária para a secundária. Ela é composta por uma variedade de polissacarídeos que contêm, como unidades básicas, o ácido galacturônico. A pectina atua como agente cimentante e hidratante da estrutura da parede celular (SOEST, 1994) e entre outros compostos da parede celular e são dez vezes menos concentrados nas plantas monocotiledôneas (ex: gramíneas forrageiras tropicais) do que dicotiledôneas (ex: maçãs, beterraba, laranja), podendo alcançar mais do que 20% da MS de alguns tecidos. Desta maneira, o conteúdo de pectina nas leguminosas é mais elevado do que nas gramíneas, nas quais é tão baixo que, frequentemente, é ignorado nas análises (SOEST, 1994). Entretanto, na família das gramíneas, as pectinas representam menos de 0,1% da MS. Na maioria das plantas, a pectina é depositada na lamela média, entre a parede celular primária das células, especialmente em tecidos jovens sob um rápido crescimento e de umidade elevada. Na presença de cálcio em baixo pH, a pectina forma um gel de baixa viscosidade. No ambiente ruminal, essas substâncias são rapidamente degradadas pelos microrganismos.

2.3.1 Classificação das enzimas

As enzimas são amplamente classificadas de acordo com o substrato sobre o qual agem e com relação à sua especificidade. De acordo com o sistema de classificação das enzimas proposto pela International Union of Biochemistry (IUB), as enzimas podem ser divididas basicamente em oxidorreduções, transferases, liases, isomerases, ligases e hidrolases. As enzimas fibrolíticas fazem parte do grupo das hidrolases. Este sistema foi baseado no tipo de reação que as enzimas catalisam e na sua especificidade quanto ao substrato (PALOHEIMO; PIRONEN; VEHAMAAANPERÄ, 2010). Entretanto, a IUB não leva em consideração as características estruturais das enzimas. Como um aprimoramento dessa classificação, um sistema algoritmo foi proposto e atribuiu seqüências numéricas classificatórias para as várias famílias de enzimas existentes, leva em consideração tanto a estrutura quanto o modo de ação desempenhado pela enzima (WITHERS; WILLIAMS, 2013). Neste sistema, as enzimas fibrolíticas são classificadas como hidrolases glicosídicas (HG) e geraram mais de 100 grupos no total, cada uma contendo seqüências numéricas especificando as proteínas componentes, funções e mecanismo de ação.

2.3.2 Origem e caracterização das enzimas fibrolíticas

As enzimas fibrolíticas comerciais são originárias de extratos de fermentação de bactérias do gênero *Bacillus spp.* ou de fungos dos gêneros *Trichoderma e Aspergillus spp.* (BEAUCHEMIN; COLOMBATTO; MORGAVI, 2004). Durante a Segunda Guerra Mundial, soldados das forças armadas norte-americanas, instalados nas ilhas Solomon, no Pacífico Sul notaram que durante os treinamentos em locais específicos ocorria a deterioração de fardas, bolsas e demais objetos dos acampamentos, fabricados de algodão. Especialistas estudaram diferentes substâncias e microrganismos potencialmente capazes de causar tais efeitos. O grupo liderado pelo Dr. Elwyn

T. Reese descobriu um fungo filamentoso, identificado como *Trichoderma viride*. Este fungo foi caracterizado por secretar enzimas capazes de degradar celulose.

O conjunto de enzimas responsáveis pela degradação da celulose é denominado complexo celulase. A classificação das celulases, de acordo com seu local de atuação no substrato celulósico, as divide em três grandes grupos: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases.

As endoglucanases (EnG: 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase) clivam ligações internas da fibra celulósica. São enzimas responsáveis por iniciar a hidrólise e pela rápida solubilização do polímero de celulose (redução do grau de polimerização), fragmentando-a em moléculas menores. Tais enzimas hidrolisam as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor.

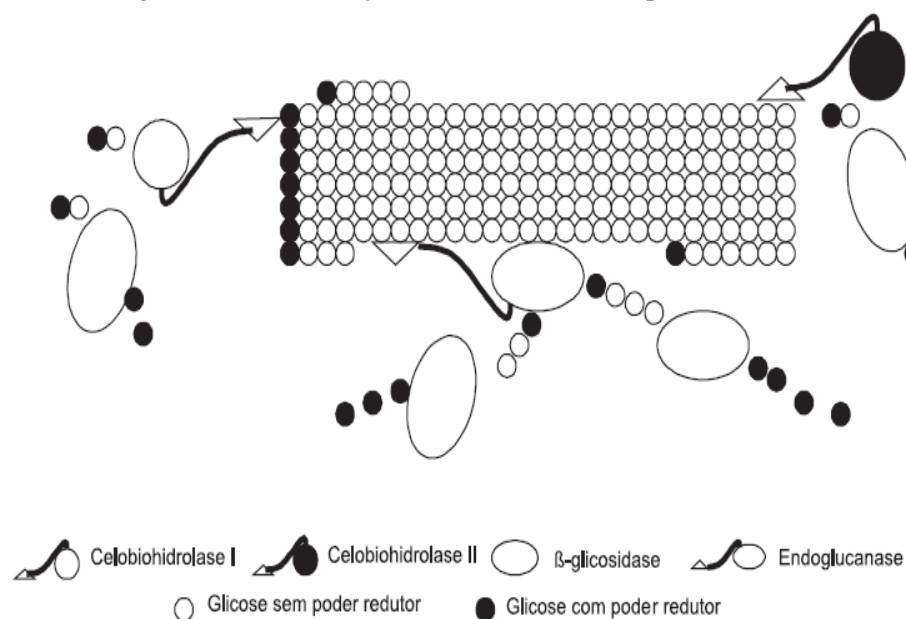
As exoglucanases são enzimas divididas em celobio-hidrolases (CBHs: 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase) e glucano-hidrolases (GHs: 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase). As GHs são capazes de liberar glicose diretamente do polímero. Já as CBHs são responsáveis pela liberação de celobiose (dímero de glicose) a partir de extremidades da celulose. As exoglucanases participam da hidrólise primária da fibra e são responsáveis pela amorfogênese, que é um fenômeno que envolve uma ruptura física do substrato, resultando na desestratificação das fibras, pelo aumento das regiões intersticiais. A amorfogênese promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas às celulases.

O terceiro e último grande grupo de enzimas do complexo celulolítico engloba a β -glicosidase (BG: β -glicosídeo gluco-hidrolase). A BG tem a propriedade de hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis (com menos de sete unidades monoméricas) em glicose (ANDRIC et al., 2010). Elas também

são responsáveis pela amorfogênese. Assim como as CBH, as BGs também são capazes de sofrer inibição por seu produto de hidrólise.

De acordo com Bansal et al. (2009), a hidrólise da celulose envolve mais passos do que a cinética clássica de enzimas. Os passos envolvidos nesse processo são: 1) adsorção de celulases sobre o substrato por meio do complexo de ligação de carboidratos; 2) localização de uma ligação clivável na superfície do substrato; 3) formação de um complexo enzima-substrato; 4) hidrólise das ligações glicosídicas ao longo da cadeia de celulose dando origem aos oligômeros menores; 5) separação das celulases aos substratos ou repete 2 e 3 dependendo do tamanho da cadeia do substrato; 6) a hidrólise de celobiose à glicose por β -glicosidase. A inibição do produto pelo excesso de substrato pode afetar a dinâmica e a velocidade dos passos acima citados (FIGURA 5).

Figura 5 - Modo de ação das enzimas do complexo celulolítico.



Fonte: Adaptado de Castro e Pereira Júnior (2010).

Xilanases ou hemicelulases são enzimas que degradam o polissacarídeo linear β -1,4-xilano (xilanas) até a unidade básica xilose, decompondo assim a hemicelulose, das paredes celulares das plantas. As hemiceluloses, ou xilanas, têm origens variadas que confere diversidade na composição, principalmente estrutural. A degradação enzimática das xilanas ocorre pela ação conjunta de endo e exo-xilanases (β -1,4-D-xilana hidrolase), que hidrolizam a cadeia principal da xilana, e β -xilosidases (β -D-xilosideo xilohidrolase) que degradam xilo-oligômeros até a unidade básica, a xilose. Quando a cadeia de hemicelulose é heterogênea, outras hemicelulases como a β -manosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, α -D galactosidase, acetil xilano esterase, e esterase de ácido ferrúlico são necessárias para a hidrólise (BEAUCHEMIN; YANG; RODE, 2003; BHAT; HAZLEWOOD, 2001). De acordo com Fanutti et al. (1995), a beta-1,4-xilanase hidrolisa o polissacarídeo beta-1,4-xilano, o principal componente da porção hemicelulose das paredes celulares das forragens. Alguns tipos de hemicelulases, derivadas principalmente de microrganismos anaeróbios, têm a característica de associar-se mais na forma de complexos multi-enzimáticos celulase-hemicelulase do que na forma individual. Esses pesquisadores verificaram em vários estudos que enzimas provenientes de fungos anaeróbios são particularmente mais ativas contra os polissacarídeos estruturais mais recalcitrantes da planta e observaram que esses organismos produzem celulases e hemicelulases que se associam formando complexos multi-enzimáticos com alta afinidade de adesão à celulose, desempenhando grande efeito celulolítico.

Murashima e Kosugi (2003) observaram que a forma, disposição e composição da parede celular das plantas dificultam a degradação promovida pelas celulases ou hemicelulases puras. Esses autores verificam baixa atividade de degradação da fibra com a aplicação dessas enzimas puras. Entretanto, quando aplicadas conjuntamente, na proporção de 1:2 (xilanases:celulases),

ocorreu maior grau de degradação da parede celular da planta. Os valores de ambos os xilo-oligossacarídeos e celo-oligossacarídeos liberados das paredes celulares da silagem de milho foram aumentados pela ação sinérgica de xilanases e celulases.

A degradação da pectina no rúmen pode ser realizada através de pectinases produzidas por fungos como *Aspergillus spp.*, e pelas bactérias dos gêneros: *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*, *Verticillium spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Penicillium spp.* Esses microrganismos podem produzir apenas um tipo ou combinações entre os tipos de pectinases (pectina liase, poligalacturonase, pectina esterase) (CHENG et al., 1995).

2.3.3 Ação enzimática no desempenho, fisiologia e digestibilidade de vacas leiteiras

A forma de ação das enzimas ainda não está bem entendida, por isso, o mecanismo pelo qual estas proteínas atuam na degradação da fibra é alvo de estudos recentes. O modo de ação de enzimas fibrolíticas é geralmente por hidrólise de componentes da planta, normalmente caracterizados por possuírem baixa digestibilidade (frações ricas em FDN), melhorando o valor nutritivo dos alimentos (MUCK; KUNG, 1997). O tratamento enzimático diminui as frações indisponíveis de carboidratos tornando a parede celular mais degradável (GWAYUMBA; CHRISTENSEN, 1997). Vários mecanismos de ação enzimática têm sido postulados, incluindo hidrólise direta (COLOMBATTO et al., 2003b; SHEPERD; KUNG, 1996), estimulação de microrganismos à adesão aos substratos (MORGAVI et al., 2000; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 1999), aumento de palatabilidade (ADESOGAN, 2005), modificação da viscosidade fecal (OFFINER, 2000) e mudanças no sistema de digestão (HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 2000; RODE; BEAUCHEMIN, 1998).

Morgavi et al. (2000), sugere a existência de forte sinergismo entre as enzimas fibrolíticas do rúmen e as enzimas suplementadas na dieta. No trabalho realizado por esses autores, foi testado o efeito de 11 preparações enzimáticas com atividade fibrolítica (celulases e xilanases extraídas do fungo *Trichoderma longibrachiatum*) com variação no pH do meio de cultivo *in vitro* (4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) a 39 °C. As 11 preparações enzimáticas utilizadas foram formadas pela combinação entre enzimas exógenas e enzimas endógenas. As enzimas endógenas purificadas em laboratório foram coletadas de novilhos de corte recebendo dietas à base de silagem de milho. A atividade enzimática foi maior quando as enzimas exógenas e as extraídas do rúmen foram adicionadas concomitantemente. A hidrólise da celulose, xilanas e silagem de milho foram aumentadas em 35, 100, e 40%, respectivamente, sendo mais evidente em pH variando de 5,0 a 6,0.

Maior digestibilidade da fibra também foi relacionada com o aumento na colonização microbiana da partícula. Yang, Beauchemin e Rode (1999) observaram que o aumento no desaparecimento da MS do alimento foi associado à maior colonização microbiana, observada no resíduo da digestão. A adesão dos microrganismos aos substratos parece ser em função da disponibilidade de nutrientes, que por sua vez potencializam a expressão do glicocalix das bactérias, permitindo maior adesão destas aos substratos. As enzimas também podem atuar por destruição de barreiras (ex: cutícula) e compostos químicos (ex: taninos) que protegem a parede celular impedindo a adesão bacteriana. Outra explicação para o aumento na adesão dos microrganismos à fibra seria pela quimiotaxia das enzimas. O aumento na população microbiana do rúmen foi verificado com a adição de enzimas de origem fúngicas (*Aspergillus oryzae*). Isto provavelmente ocorre em função da maior disponibilidade de substratos da fermentação ruminal e ao maior aproveitamento do nitrogênio disponível no

rúmen, promovendo maior síntese e fluxo de proteína microbiana para o duodeno.

A viscosidade intestinal pode afetar a absorção de nutrientes. Polissacarídeos como beta-glucanos estão presentes em maiores concentrações em dietas à base de cevada e podem prejudicar a absorção de nutrientes no intestino por aumentar a viscosidade da digesta e diminuir o contato dos nutrientes com a mucosa, ou por alterar a morfologia do epitélio intestinal (HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 2000). Em monogástricos, os benefícios da ação enzimática são principalmente obtidos pela habilidade da mesma em diminuir a viscosidade da digesta no duodeno, facilitando desta forma a absorção dos nutrientes (BEDFORD et al., 1995). Poucos são os trabalhos que comprovam de maneira concreta a forma de atuação das enzimas. Mais pesquisas envolvendo tanto técnicas *in vitro* quanto *in vivo* são necessárias para estruturar os mecanismos citados. Os efeitos intestinais das enzimas são apenas especulações e pouco elucidativas. Grande parte dos trabalhos publicados é deficitária com relação a detalhamento sobre o tipo de enzima utilizada e o método de avaliação da resposta animal empregada, dificultando a comparação entre resultados dos diferentes experimentos. Resultados parecem ser afetados por uma infinidade de fatores incluindo composição da dieta, tipo de preparação enzimática usada, concentração da enzima adicionada, estabilidade e método de aplicação (RODE; BEAUCHEMIN, 1998).

2.3.4 Enzimas fibrolíticas exógenas

A resposta de vacas leiteiras suplementadas com enzimas fibrolíticas tem sido relatada como muito variável. Essa variação pode ser atribuída a diferenças no estágio de lactação das vacas (LEWIS et al., 1999; RODE; YANG; BEAUCHEMIN, 1999), tipo, atividade e características das enzimas (BOWMAN; BEAUCHEMIN; SHELFORD, 2002; DAWSON; TRICARICO,

1999), sub e super dosagem das enzimas (BEAUCHEMIN; RODE; SEWALT, 1995; KUNG JUNIOR et al., 2000), métodos de suplementação enzimática (SUTTON et al., 2003).

Bowman, Beauchemin e Shelford (2002) avaliaram a suplementação de enzimas fibrolíticas contendo atividade de celulases e xilanases para vacas leiteiras. Oito vacas foram utilizadas para avaliar os tratamentos em delineamento experimental do tipo quadrado latino 4 x 4. Os tratamentos foram: 1) controle (sem a adição de enzimas), 2) enzima aplicada ao concentrado (45% da MS), 3) ao suplemento (4% da MS) e 4) ao mineral (0,2% da MS). A digestibilidade no trato digestivo total da MO, FDN e FDA foi maior no tratamento com enzima fornecida no concentrado. Os outros tratamentos produziram apenas aumentos numéricos das digestibilidades quando comparados ao tratamento controle. No entanto, houve um aumento na síntese de N microbiano em vacas que receberam a suplementação de enzimas no concentrado peletizado. A suplementação enzimática não afetou a produção e composição do leite, mas vacas que receberam a suplementação de enzimas junto ao concentrado tenderam a produzir mais leite corrigido para 4% de gordura. Os resultados demonstraram que a forma de suplementação foi mais eficiente quando aplicado aos ingredientes de maior proporção da TMR.

Lewis et al. (1996) avaliaram o método de fornecimento de solução contendo celulases e xilanases na digestibilidade de dietas de alta forragem. Oito novilhos de corte canulados foram alimentados com dieta contendo 70% MS de feno de capim e 30% MS de cevada (% MS). Os tratamentos foram adicionados à dieta controle na fração forragem. A enzima foi acrescida à forragem 24h antes da alimentação (F24), na forragem imediatamente antes da alimentação (F0), na cevada imediatamente antes da alimentação (C0), ou infundida no rúmen, 2h após a alimentação (IR). A taxa de desaparecimento da FDN *in situ*, tanto da cevada como do feno de capim tratado com enzimas foi maior comparado à

dieta controle. A infusão ruminal de enzimas em comparação com F24 e F0 resultou em menor desaparecimento da MS e FDN após 96h. A CMS e a FDN não foram afetadas pelos tratamentos. As digestibilidades da MS, FDN e FDA tenderam a ser maiores nas dietas F24 e F0 do que na dieta controle. Os resultados deste estudo indicaram que a aplicação da enzima diretamente sobre a forragem é capaz de melhorar a digestibilidade da forragem.

2.3.5 Estabilidade das enzimas no aparelho digestório

A estabilidade da enzima no ambiente ruminal é um ponto crítico que afeta sua eficácia como aditivo alimentar. Por muitos anos, acreditou-se que as enzimas suplementares fossem rapidamente destruídas no rúmen considerando a hipótese de que as enzimas são proteínas, e assim, estariam todas sujeitas à degradação por proteases microbianas no rúmen (KUNG, 2001). Algumas enzimas perdem rapidamente a sua atividade quando incubadas em fluido ruminal, devido à proteólise causada por condições desfavoráveis de pH e temperatura. Entretanto, Hristov et al. (1996) observaram que muitas enzimas foram estáveis no ambiente ruminal onde é o principal local de atuação das enzimas fibrolíticas. A ação fibrolítica das enzimas endógenas pode ser diminuída, e até inibida, quando o pH ruminal é menor que 6,0. Já as enzimas de origem fúngicas exógenas são mais efetivas em pH abaixo de 6,0. Nesse sentido, a adição de enzimas exógenas em dietas de alta fermentabilidade pode ser uma estratégia para diminuir os efeitos negativos do baixo pH sobre digestão de fibras.

Kung (2001) relatou que um complexo enzimático à base de celulases foi rapidamente degradada por proteases bacterianas do rúmen e a sua adição ao fluido ruminal não teve efeito sobre a digestão de fibra *in vitro*. Já Kung Junior et al. (2002) verificaram que a atividade de enzimas fibrolíticas pode apresentar efeitos diferentes em função do meio em que as enzimas são testadas. Esses

autores avaliaram duas preparações enzimáticas à base de xilanases (B e C) a 40 °C em diferentes faixas de pH. A atividade da enzima C foi maior em pH de 6,5, mas foi substancialmente reduzida como a diminuição do pH. Em contraste, a xilanase B apresentou maior atividade em pH 5. Em pH entre 5,5 e 6,0 a atividade de xilanase B foi o dobro da xilanase C.

O efeito do pH afetando a efetividade das enzimas fibrolíticas foi verificado por Morgavi et al. (2001). Esses autores avaliaram a estabilidade de um complexo enzimático composto de celulases oriundos de *Trichoderma spp* em diferentes temperaturas e pH em culturas *in vitro*. A atividade dessas enzimas foi máxima em pH e temperatura 4,5 e 50 °C respectivamente. Colombatto et al. (2003a) demonstraram que a atividade da enzima xilanase contidas em duas preparações enzimáticas comerciais (Depol 40 e LiquiCell 2500) apresentavam atividade ótima em pH 5,6 e ambos os produtos apresentaram 30% de diminuição da eficiência após 48h de incubação 39 °C no líquido ruminal.

Fontes et al. (1995) avaliaram diferentes tipos de enzimas fibrolíticas com atividade sobre a celulose (celulases) e hemicelulose (xilanases) com relação à resistência à atividade proteolítica utilizando ensaios *in vitro*. Esses autores verificaram que celulases foram resistentes ao ataque proteolítico. Por outro lado, Hristov et al. (1996) verificaram que xilanases possuem maior estabilidade no rúmen do que as celulases. Esses autores sugerem que esse efeito pode ser devido à estrutura relativamente grande e complexa de celulases em comparação com xilanases. Morgavi et al. (2001) observaram que as preparações enzimáticas oriundas de *Trichoderma longibrachiatum* incubadas até 6h no líquido ruminal foram notavelmente estáveis. A atividade das enzimas celulase e 1,4-beta-cellobiosidase foram menos estáveis, seguido por xilanase, ao passo que a atividade de beta-glucanase não foi afetada.

As enzimas fibrolíticas podem exercer seu efeito sobre a digestibilidade dos alimentos tanto no rúmen quanto no intestino delgado (RODE; BEAUCHEMIN, 1998). Portanto, a estabilidade é muito importante para que estas enzimas permaneçam ativas no intestino. De acordo com Fontes et al. (1995), a estabilidade de xilanases e celulasas no rúmen pode estar relacionada com a glicosilação, que pode protegê-las da inativação por ação de proteases e temperatura. Muitas xilanases e celulasas oriundas de bactérias e fontes fúngicas são glicosiladas. A glicosilação envolve ligações covalentes de monossacarídeos com alguns aminoácidos específicos da cadeia lateral da estrutura das enzimas e a glicosilação pode conferir resistência à proteólise tanto em monogástricos como no fluido ruminal (FONTES et al., 1995).

A integridade das enzimas fibrolíticas no rúmen também depende do *pool* de enzimas proteolíticas preexistentes no fluido ruminal do animal hospedeiro, que pode ser variável (FALCONER; WALLACE, 1998). Por exemplo, a estabilidade das enzimas fibrolíticas exógenas testadas *in vitro* pode ser afetada já no momento de coleta do fluido ruminal, assim como, pela dieta a qual os animais foram alimentados. A atividade fibrolítica das enzimas no fluido ruminal de vacas antes da alimentação é bastante reduzida comparada com a suplementação após a alimentação (MORGAVI et al., 2001). Este fato pode estar associado à maior disponibilidade de substratos após a alimentação, o que permite que os microrganismos proteolíticos colonizem as partículas dos alimentos e exerçam o efeito enzimático, diminuindo o efeito direto sobre as enzimas fibrolíticas.

Hristov, McAllister e Cheng (2000) observaram que o aumento das doses de enzimas fibrolíticas adicionadas à dieta de novilhas aumentou linearmente a atividade enzimática e de degradação de carboidratos no fluido ruminal. Além disso, os autores observaram que os níveis elevados de atividade fibrolítica no rúmen resultou em aumento das atividades de xilanase e β -

glicosidase na digesta duodenal. A atividade de xilanase nas fezes aumentou linearmente com o aumento da suplementação enzimática exógena, demonstrando que a maior disponibilidade de carboidratos resultantes da degradação de fibras potencializou a atividade enzimática ao longo do trato digestivo total dos animais.

2.3.6 Determinação da atividade enzimática

De acordo com Beauchemin, Yang e Rode (2003), as atividades enzimáticas são geralmente determinadas pela mensuração da taxa de liberação de açúcares redutores provenientes de substratos puros, com a unidade expressa como a quantidade de açúcares redutores liberados por unidade de tempo por unidade de enzima. O substrato mais comumente utilizado para a medição da atividade da celulase (atividade da endo-1,4-beta-glucanase) é a carboximetil celulose (WOOD; BHAT, 1988). A atividade da exoglucanase pode ser medida utilizando preparações de celulose cristalina. A atividade da beta-glicosidase é determinada através da medição da liberação de glicose a partir de celobiose, ou a liberação de p-nitrofenol a partir de P-nitrofenil-beta-D-glicose. A atividade da xilanase pode ser medida pela liberação de açúcares redutores provenientes da molécula de xilana, carboidrato muito presente na aveia (*Avena sativa*). As xilanases têm afinidade com ligações internas β -1 das moléculas das xilanas (BHAT; HAZLEWOOD, 2001).

As mensurações da atividade de enzimas devem ser realizadas sob condições bem definidas de temperatura, pH, tipo e concentração de substrato porque esses fatores exercem efeito direto sobre a ação enzimática. A temperatura ótima para a maioria das enzimas fibrolíticas comerciais é de aproximadamente 60 °C e pH entre 4 e 5 (COUGHLAN, 1985). No entanto, essas condições são diferentes das encontradas no ambiente ruminal que normalmente possui pH de 6,0 a 6,7 e temperatura de 39 °C (SOEST, 1994).

2.3.7 Efeito do tratamento enzimático no comportamento ingestivo e ambiente ruminal

Alterações no processamento mecânico (BEAUCHEMIN et al., 1997) e nas propriedades químicas (RODE; BEAUCHEMIN, 1998) dos alimentos podem alterar significativamente o comportamento ingestivo de ruminantes. Forragens com menor TP podem diminuir a ruminação, salivação e pH ruminal, levando à diminuição da digestão de fibras (RUSSELL; WILSON, 1996). A suplementação de enzimas fibrolíticas melhorou a digestão de fibras (RODE; YANG; BEAUCHEMIN, 1999; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 2000) e reduziu o pH ruminal em alguns trabalhos (LEWIS et al., 1996) mas não em outros (YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 1999). Bowman, Beauchemin e Shelford (2003) investigaram os efeitos da suplementação enzimática sobre a mastigação, comportamento ingestivo, secreção de saliva e pH ruminal de vacas leiteiras em lactação fistuladas no rúmen. A suplementação enzimática não alterou o tempo de ingestão ou ruminação, mas aumentou a produção de saliva. De acordo com os autores, a suplementação de enzimas fibrolíticas não alterou a estrutura física da TMR e o aumento na produção total de saliva, observado nos tratamentos com enzima, pode ser atribuído a uma resposta fisiológica para compensar o aumento de ácidos oriundos da fermentação ruminal. Beauchemin et al. (2000) avaliaram duas doses de uma mistura enzimática à base de celulase e xilanase (0,5 vs. 1,5 mg/g de forragem), adicionadas à dieta de vacas leiteiras, contendo 45% forragem e 55% de concentrado. Os autores não verificaram diferença no tempo gasto para ingestão entre as dietas. Entretanto, o CMS das vacas nos tratamentos com suplementação de enzimas foi maior comparado ao tratamento controle. Assim, a adição de enzimas nas dietas diminuiu o tempo gasto para ingestão por unidade de MS, FDN e FDA. Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos com relação à baixa e alta concentração de enzimas. Segundo os autores, a diminuição no tempo de ingestão por unidade de

fibra sugere que a mistura de enzimas pode ter causado um efeito pré-ingestivo, aumentando a facilidade de mastigação.

2.3.8 Efeito de enzimas fibrolíticas na população microbiana ruminal

A atividade enzimática no rúmen é muito diversificada e é composta principalmente por grupos de celulases, xilanases, pectinases, alfa-glucanases, amilases, proteases, fitases e aqueles que degradam toxinas específicas como, por exemplo, taninases (WANG; MCALLISTER, 2002). O conjunto de enzimas atuantes no rúmen resulta da diversidade de microrganismos e as enzimas produzidas por eles. A digestão eficiente de substratos complexos no rúmen requer a atividade coordenada dessas enzimas.

As limitações da digestão da parede celular de plantas no rúmen podem ser devido à menor quantidade e variedade de enzimas específicas produzidas pelos microrganismos do rúmen, inabilidade das enzimas degradativas em interagir com substratos alvo ou de ambiente pouco propício para a atividade enzimática ótima, como baixo pH ruminal (MCALLISTER et al., 2001). De acordo com Morgavi et al. (2000), enzimas fibrolíticas utilizadas para melhorar digestão em ruminantes interagem, não só com os alimentos, mas também com os microrganismos ruminais. Esses autores relataram um aumento na população de microrganismos ruminais devido à adição de enzimas fibrolíticas exógenas em diferentes substratos. No entanto, não ficou claro se este efeito foi devido à modificação direta na estrutura do alimento ou indireta pela estimulação do crescimento da microbiota ruminal.

A taxa de inclusão de enzimas fibrolíticas exógenas na alimentação de ruminantes varia normalmente em torno de 0,01 a 0,1% da dieta, podendo aumentar a atividade fibrolítica no rúmen de 10 a 100 vezes (CHRISTENSEN, 1997). Baseado na atividade fibrolítica média da fração fluida no rúmen, estima-se que as enzimas suplementares podem contribuir com até 15% da atividade

fibrolítica total. No entanto, a atividade de enzimas comerciais é medida em meios de cultura que apresentam valores de pH e temperatura, geralmente diferentes do que ocorre no rúmen. Assim, uma vez atuando no rúmen, enzimas exógenas provavelmente agem consideravelmente menos do que o previsto. A atividade das enzimas fibrolíticas associadas às partículas é nitidamente mais elevada do que no fluido ruminal (RODE; BEAUCHEMIN, 1998). Isto ocorre provavelmente porque a fixação dos microrganismos às partículas fibrosas permite que as enzimas atuem diretamente no substrato, aumentando assim a ação catalítica da enzima.

Morgavi et al. (2000) estudaram o efeito de uma preparação enzimática a partir de *T. longibrachiatum* (TE) sobre o crescimento de *F. succinogenes* em meio contendo celobiose, celulose cristalina ou silagem de milho. Foram avaliados produtos da fermentação e o desaparecimento da fibra. A taxa de crescimento de *F. succinogenes* sobre celobiose não foi afetada por TE. Mas o crescimento em celulose foi maior, embora a produção de gás e o desaparecimento do substrato não foram afetados. Quando se utilizou fibra de silagem de milho, a adição de TE aumentou o desaparecimento de FDN após 24 e 48h (33 e 52% no tratamento controle vs. 53% e 65% nos tratamentos com TE respectivamente). A adição de enzimas exógenas do fungo *Trichoderma longibrachiatum* não interferiu na ação da *F. Succinogenes*, e esse efeito provavelmente ocorreu porque este último foi, per si, capaz de digerir celulose eficientemente e a adição de celulasas exógenas não aumentou o desaparecimento de celulose. No entanto, TE aumentou a degradação da fibra de silagem de milho, provavelmente pela incorporação de uma ou mais enzimas insuficientemente produzidas por *F. succinogenes*. Os resultados sugerem que as preparações enzimáticas podem influenciar positivamente a colonização de microrganismos nas partículas de fibras e aumentar a taxa de degradação da fibra no rúmen.

Nsereko, Morgavi e Rode (2000) avaliaram a atividade *in vitro* de uma mistura enzimática com atividade de celulase, xilanase e amilase oriundas do fungo *Trichoderma longibrachiatum*. As dosagens foram 0, 1, 2, 5 ou 10 g por tonelada de MS e essas dosagens estimularam o número total de bactérias viáveis no rúmen em 100, 330, 390 e 250% respectivamente. Os microrganismos ruminais mais responsivos à suplementação enzimática, e ordem, foram os subgrupos de bactérias celobiolíticas, xilanolíticas e amilolíticas. Estes dados sugerem que as enzimas exógenas podem melhorar a digestão de fibra no rúmen por estimular crescimento de bactérias ruminais que utilizam hemicelulose e produtos secundários de digestão de celulose.

Colombatto et al. (2003a) avaliaram o relacionamento entre as características bioquímicas e a atividade de degradação ruminal *in vitro* de 22 enzimas fibrolíticas exógenas. Após ensaios prévios de mensuração da efetividade fibrolítica, foram selecionadas três preparações enzimáticas. As forragens utilizadas como substrato foram a alfafa e a silagem de milho. A concentração das enzimas foi de 1,5 mg/g de forragem. As enzimas foram aplicadas nas forragens 24 e 0h antes da incubação no fluido ruminal para avaliar possíveis efeitos pré ingestivos das enzimas. De acordo com os autores, a adição das enzimas como xilanase, endoglucanase e α -D-glucosidase foram responsáveis por 50 e 85% da degradação da fibra da silagem de milho e alfafa durante 48h respectivamente. Além disso, a adição de enzimas exógenas aumentou a taxa de produção de gás, o que sugere que a fermentação da celulose e hemicelulose também foi potencializada pela adição de enzimas. No entanto, a adição de enzima a níveis superiores a 2 mg/g de forragem não aumentou a produção de gás, o que indica que o nível máximo de estimulação foi atingido em concentrações inferiores de enzimas. Os mecanismos de ação das enzimas parecem ser afetados pelo tipo de forragem. Quando adicionadas à alfafa, as enzimas exerceram parte de seu efeito durante o período de pré-tratamento (com

a adição apenas do substrato e solução tampão), enquanto as enzimas eficazes para silagem de milho atuaram exclusivamente depois do líquido ruminal ter sido adicionado. Esses resultados sugerem diferentes mecanismos de ação nas duas forragens utilizadas, demonstrando especificidade das enzimas quanto aos substratos. Em alfafa, parece que as enzimas eficazes funcionam através da remoção de obstáculos estruturais que retardam a colonização microbiana das frações digestíveis, aumentando a taxa de degradação. Na silagem de milho, enzimas exógenas parecem interagir com as enzimas do rúmen para degradar a forrageira mais rapidamente, o que é consistente com os resultados anteriores de sinergismos entre enzimas exógenas e ruminais. Os autores concluíram que a adição de enzimas aumentou a degradação de celulose e xilanas, pela ação direta das enzimas na liberação de açúcares redutores e também na estimulação de microrganismos degradadores de fibra resultando numa maior taxa de fermentação, com diferentes mecanismos de ação.

2.3.9 Efeito de enzimas fibrolíticas sobre o desempenho animal

Enzimas fibrolíticas podem afetar positivamente o desempenho animal. Entretanto as respostas à suplementação de enzimas têm sido bastante variadas (ADESOGAN, 2005). As variações nos resultados de desempenho podem estar associadas ao estágio de lactação das vacas avaliadas, concentração e composição da mistura enzimática, especificidade da enzima ao substrato, fração do alimento e tempo entre a aplicação da enzima e o fornecimento da dieta aos animais (ADESOGAN et al., 2014). Esses fatores podem afetar o consumo, digestibilidade e conseqüentemente a produção animal. O CMS foi maior (BEAUCHEMIN et al., 2000), inalterado (KUNG JUNIOR et al., 2000) ou com respostas pequenas e inconsistentes (RODE; YANG; BEAUCHEMIN, 1999; SCHINGOETHE; STEGEMAN; TREACHER, 1999; VICINI et al., 2003; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 1999) em vários trabalhos. A produção de

leite foi maior em alguns estudos com a utilização de enzimas (KUNG JUNIOR et al., 2002; RODE; YANG; BEAUCHEMIN, 1999; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 2000), mas não foi alterada em outros (BEAUCHEMIN et al., 2000; SHEPERD; KUNG, 1996; VICINI et al., 2003). As respostas em produção de leite são geralmente positivas, mas muitas vezes não significativas, enquanto que alterações na concentração de sólidos mostram respostas positivas para gordura, negativas para proteína e muitas vezes não são significativas (BEAUCHEMIN; YANG; RODE, 1999; KUNG JUNIOR et al., 2000; LEWIS et al., 1999; SCHINGOETHE; STEGEMAN; TREACHER, 1999; VICINI et al., 2003; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 1999). Adicionalmente, dados recentes demonstram efeitos de preparações enzimáticas à base de enzimas fibrolíticas sobre a digestibilidade (SCHINGOETHE; STEGEMAN; TREACHER, 1999; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 1999) e eficiência alimentar (ADESOGAN et al., 2007, 2014).

Rode, Yang e Beauchemin (1999) utilizaram vinte vacas Holandês em começo de lactação para avaliar o efeito da suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o CMS, produção de leite e digestibilidade. A mistura enzimática foi adicionada na concentração de 1,3 mg/kg da TMR na MS. A dieta continha 24% de silagem de milho e 15% de feno de alfafa como fontes de forragem. A adição da enzima não afetou o CMS (19,0 kg/d), mas tendeu a aumentar a produção de leite (39,5 vs. 35,9 kg/d), como consequência do aumento em digestibilidade da MS (69,1 vs. 61,7) e da matéria orgânica (70,6 vs. 63,9). A porcentagem de gordura do leite foi menor (3,37 vs. 3,87) e a porcentagem de proteína do leite tendeu a ser menor (3,32 vs. 3,03) no tratamento com suplementação enzimática. O balanço energético negativo foi numericamente menor nas vacas alimentadas com a dieta suplementada com enzima comparado ao controle (-3,33 vs. -3,62 Mcal/d). Os autores concluíram que a suplementação enzimática em dietas de vacas leiteiras em início de

lactação pode aumentar a produção de leite e digestibilidade sem, no entanto, afetar o CMS.

Estudos têm demonstrado que a resposta em desempenho animal pode ser influenciada pela forma de aplicação e concentração das enzimas suplementadas. Yang, Beauchemin e Rode (1999) examinaram o efeito de duas doses de uma mistura enzimática à base de celulase e xilanase aplicadas na forragem, no concentrado ou na dieta completa de vacas leiteiras. Eles observaram que a produção de leite foi maior no tratamento com dose elevada da enzima em comparação com vacas alimentadas com a dieta controle, mas os efeitos sobre a composição do leite foram mínimos. A resposta à suplementação enzimática foi mais afetada pela quantidade de enzima aplicada do que pelo componente dietético utilizado para veicular a enzima.

Lewis et al. (1999) realizaram dois experimentos para avaliar a influência da forma de aplicação e dosagem de uma mistura enzimática à base de celulasas e xilanas sobre a produção de vacas leiteiras. No Experimento 1, as vacas receberam dietas contendo feno de alfafa tratada ou não com a mistura de enzimas entre 8 e 24h antes da alimentação. Eles observaram que as vacas consumindo forragem tratada com enzima produziram mais leite (27,2 vs. 25,9 kg/d) e tiveram maior digestibilidade da MS comparado com as vacas alimentadas com forragem controle. No Experimento 2, vacas em início da lactação receberam um dos quatro tratamentos por 16 semanas: 1) Ausência de enzimas, 2) Enzima em dose baixa (1,25 g da mistura enzimática por kg de MS da forragem), 3) Enzima em dose média (2,5 g da mistura enzimática por kg de MS da forragem), ou 4) Enzima em dose alta (5,0 g da mistura enzimática por kg de MS da forragem). A CMS nos tratamentos com a suplementação de enzimas foi maior comparado ao controle, mas não houve diferença entre as doses de enzimas. A produção de leite, LCG e LCE foi maior nas vacas que receberam o tratamento 3 (dose média) comparado ao tratamento 1 (controle).

Portanto, a aplicação prévia de enzimas fibrolíticas sobre a forragem melhorou o desempenho de vacas leiteiras em início e meio de lactação.

Sutton et al. (2003) utilizaram vacas multíparas com cânulas ruminais e duodenais em início de lactação para investigar o efeito do método de aplicação de enzimas fibrolíticas sobre a digestibilidade e produção de leite. Os tratamentos foram: controle (sem adição de enzima); enzima aplicada sobre a TMR antes da alimentação da manhã (TMR-E), enzima aplicada sobre o concentrado no dia anterior (Conc-E), ou infundida no rúmen durante 14h/d (Rumen-E). Não houve efeito dos tratamentos sobre o consumo de MS ou produção de leite. Não foram detectadas diferenças na digestibilidade ruminal da MS, MO ou amido ao longo dos tratamentos. A digestibilidade ruminal da FDN foi menor nas vacas alimentadas com TMR-E, mas essas vacas tiveram maior digestibilidade pós ruminal da FDN. A digestibilidade de amido, MS e MO no trato digestivo total foram maiores nas vacas alimentadas com TMR-E. O tempo de retenção ruminal foi reduzido em todos os tratamentos com enzimas, mas o tempo de trânsito alimentar pós ruminal não foi aumentado, conseqüentemente, o efeito da suplementação enzimática sobre o tempo de retenção da digesta no trato digestivo total não foi significativo. Os autores concluem que os resultados ocorridos no experimento podem ser atribuídos, em parte, à alteração no tempo de retenção de partículas no rúmen e conseqüentemente na capacidade fibrolíticas.

Schingoethe, Stegeman e Treacher (1999) avaliaram a resposta de vacas leiteiras à suplementação de mistura de enzimas à base de celulase e xilanase. A mistura enzimática líquida na concentração de 100 mg/mL foi aplicada imediatamente antes do fornecimento das dietas aos animais, nas doses de 0; 0,7; 1,0 ou 1,5 L /tonelada de MS da porção forragem da dieta (60% de silagem de milho e 40% de feno de alfafa). A produção de leite, produção de gordura e proteína foram 20, 13 e 10,8% maiores nas vacas que receberam o tratamento

com maior dosagem comparada ao controle (sem adição de enzima). A resposta em produção de leite das vacas no tratamento 0,7 L foi aproximadamente a metade do aumento ocorrido no tratamento com a maior dose de aplicação das enzimas. As respostas aos tratamentos ocorreram cerca de duas a quatro semanas após o início dos tratamentos e se mantiveram até a semana 12, última semana do experimento. As vacas que iniciaram o experimento com menos de 100 dias de paridas produziram, em média, 12% mais leite e 20% mais LCE comparadas às vacas do tratamento controle. No entanto, a produção de leite não foi maior nas vacas com mais de 120 dias de paridas.

Adesogan et al. (2007) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras suplementadas com enzimas fibrolíticas, (xilanase-esterase, Dyadic International Inc., Jupiter, FL) com diferenças no momento e método de aplicação. No experimento 1, 30 vacas da raça Holandês (129 ± 6 dias em lactação) foram aleatoriamente distribuídas a um dos cinco tratamentos em períodos de 28 dias, sendo os 14 primeiros dias utilizados para adaptação. As dietas foram compostas de silagem de Tifton 85, silagem de milho e mistura de concentrados na proporção de 35, 10 e 55% na MS respectivamente. As dietas continham 16% de PB e 46,5% de FDN (% MS total da dieta). As dietas continham 46,4% de MS como proporção da matéria natural. Os tratamentos foram: 1) controle (sem adição de enzimas), 2) aplicação enzimática no momento da ensilagem do Tifton 85 (ES 1,3 g/kg de MS da dieta), 3) aplicação de enzimas fibrolíticas no concentrado na proporção de 4 g/animal/d (EC), 4) aplicação de enzimas na dieta completa (ETMR) ou 5) aplicação na forragem imediatamente antes da mistura da dieta (EF). As enzimas foram diluídas em água (na proporção de 1:5 v/v) e aspergidas sobre os tratamentos. No experimento 2, cinco vacas canuladas foram utilizadas para avaliar os efeitos da suplementação enzimática na fermentação ruminal e degradabilidade ruminal *in situ*. A suplementação de

enzimas fibrolíticas não afetou a produção de leite (32,1 kg/d), e digestibilidade da MS, MO e FDN ao longo dos tratamentos. A concentração total de AGVs não foi afetada pelos tratamentos, mas a concentração de acetato (59,2 vs. 58,6, proporção molar) e a eficiência de utilização de nitrogênio (15,1 vs. 10,1 mg/dL) foi maior para o tratamento ETMR comparado ao controle. De forma geral, a suplementação enzimática não melhorou a digestibilidade *in vivo* ou CMS nas dietas e a produção de leite e produção de constituintes do leite não foram afetadas pela adição de enzima. Não houve mudança no aporte de glicose no sangue. No entanto, ao contrário de outros métodos de aplicação, a aplicação de enzimas na dieta total (ETMR) diminuiu a mobilização de gordura, diminuiu o teor de amônia ruminal e melhorou a eficiência de utilização energética. Além disso, tendeu a melhorar a porcentagem de gordura (3,67 vs. 3,95 %) e proteína no leite (3,07 vs. 2,91 %). A suplementação de enzimas na dieta completa foi efetiva em melhorar a função ruminal quando aplicada à dieta completa, mas os efeitos sobre o metabolismo do animal e a produção de leite foram mínimos.

Arriola, Romero e Adesogan (2011) avaliaram o efeito da alta ou baixa inclusão de concentrados na suplementação de enzima com atividade fibrolítica (xilanase-esterase, Dyadic International Inc., Jupiter, FL) sobre o desempenho de vacas leiteiras. A hipótese dos autores era de que o teor de concentrado pudesse interferir no efeito enzimático e foi baseado em prévios experimentos de Eun e Beauchemin (2007) que, utilizando a mesma preparação enzimática, verificaram aumento na degradabilidade ruminal *in vitro* da MS (7 e 9%) e da FDN (31 e 32%) do feno de alfafa e da silagem de milho, respectivamente, com maior inclusão de concentrados. Sessenta vacas no início da lactação (22 ± 1 DIM) foram agrupadas por produção de leite e distribuídas aleatoriamente em quatro grupos de tratamentos em experimento inteiramente casualizados, em arranjo fatorial 2 x 2, durante 77 dias. A concentração da preparação enzimática foi de 5 mg /g de MS da dieta, diluída em água na proporção (1:3, g/v) e

aspergida na dieta completa durante a mistura dos ingredientes. Os tratamentos foram: 1) baixo concentrado, sem enzimas (LC; 67:33, forragem: concentrado); 2) baixo concentrado, com enzima (LCE; 67:33 volumoso: concentrado); 3) alto concentrado, sem enzimas (HC; 52:48 volumoso: concentrado); 4) alto concentrado, com enzima (HCE; 52:48 volumoso: concentrado). A fração forragem da dieta foi composta por 70% de silagem de milho, 20% de feno de alfafa e 10% de pré-secado de Tifton 85. De acordo com os resultados, não houve interação entre a enzima e a proporção de concentrado, exceto para produção de gordura no leite. Em dietas com baixo nível de concentrados, a aplicação de enzimas não afetou o CMS (23,4 kg/d), mas tendeu a aumentar a produção de leite (32 vs. 32,9 kg/d, $P = 0,06$) o que resultou no aumento da eficiência alimentar comparado ao controle (1,40 vs. 1,62). Nas dietas de alto concentrado, a produção de leite foi maior com a suplementação de enzimas comparada ao controle (33,5 vs. 36,5 kg/d). No contraste realizado entre vacas alimentadas com a dieta LCE (baixo concentrado com enzimas) e HC (alto concentrado sem enzima), foi revelado que as vacas comeram menos na dieta LCE (21,2 vs. 25,6 kg de MS) comparado ao controle, no entanto, a produção de leite entre essas dietas não diferiu. A eficiência da produção de leite foi maior para a dieta LCE. O baixo pH ruminal de animais alimentados com dietas alto concentrado podem ter aumentado a efetividade das enzimas. Os valores de pH no tratamento com alto concentrado foram menores comparados ao baixo concentrado (6,05 vs. 6,30). Os autores concluíram que a suplementação de vacas leiteiras com enzimas fibrolíticas aumentou a eficiência alimentar em dietas com baixo concentrado.

Romero et al. (2016) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras suplementadas com dietas contendo duas enzimas fibrolíticas exógenas (experimento 1) e o efeito das enzimas na cinética de degradação ruminal da dieta (experimento 2). As enzimas utilizadas nos experimentos 1 e 2 foram

previamente selecionadas quanto à dose e efetividade em ensaios prévios. No experimento 1, 66 vacas em início de lactação (21 ± 5 d) foram bloqueadas em relação à produção e ordem de parição (45 múltíparas e 21 primíparas) e aleatoriamente alocadas em um dos três tratamentos: 1) controle (CON, sem adição de enzimas), 2) Xilanase (2A, 1 g/kg de dieta na MS, Dyadic International, Jupiter, FL), e 3) 75:25 da mistura de enzimas celulase e xilanase (3A, 3,4 g/kg de MS da dieta). As enzimas foram diluídas em água e aspergidas durante a preparação das dietas. As dietas foram ofertadas duas vezes ao dia e continham 10% de feno de Tifton, 35% de silagem de milho, 5% de pré-secado de alfafa e 50% de concentrado com base na MS. O delineamento experimental foi do tipo blocos casualizados com duração de 84 dias, sendo os 14 primeiros dias utilizados como covariável. No experimento 2, foi avaliada a degradação ruminal da MS *in situ* e a fermentação ruminal utilizando as dietas do experimento 1 como substrato. Três vacas em lactação fistuladas no rúmen foram utilizadas. O delineamento experimental foi do tipo quadrado latino 3×3 com períodos de 23 d. No experimento 1, a aplicação da enzima 2A aumentou a CMS (23,5 vs. 22,6 kg/d), matéria orgânica (21,9 vs. 20,9 kg/d), e proteína bruta (3,9 vs. 3,7 kg/d). E ainda tendeu a aumentar a produção de LCG (41,8 vs. 40,7 kg/d) e gordura no leite (1,48 vs. 1,44 kg/d). A enzima 2A tendeu a aumentar a produção de leite durante as semanas 3 (41,2 vs. 39,8 kg/d), 6 (41,9 vs. 40,1 kg/d) e 7 (42,1 vs. 40,4 kg/d). Enquanto a preparação enzimática 3A tendeu a aumentar a produção de leite durante as semanas 6 (41,5 vs. 40,1 kg/d), 8 (41,8 vs. 40,0 kg/d), e 9 (40,9 vs. 39,5 kg/d). No experimento 2, a utilização de enzimas fibrolíticas não afetou a cinética de degradação ruminal, pH ou teor de amônia ruminal e a concentração de ácidos graxos voláteis. Os autores concluíram que a suplementação de enzimas fibrolíticas aumentou o consumo e produção de leite das vacas alimentadas com dietas contendo silagem de milho e feno de Tifton como forragens predominantes. Conseqüentemente, preparações

enzimáticas à base de celulase e xilanase podem afetar positivamente o desempenho de vacas leiteiras ingerindo dietas contendo a silagem de milho como fonte majoritária de forragem e até 10% de tifton como % da MS.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 2005, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2005. p. 91-109.
- ADESOGAN, A. T. et al. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1317-1330, Dec. 2014.
- ADESOGAN, A. T. et al. Strategic addition of dietary fibrolytic enzymes for improved performance of lactating dairy cows. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 18., 2007, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2007. p. 92-110.
- AGRICULTURAL MODELING AND TRAINING SYSTEMS. **SPARTAN 3:** spartan ration evaluator/balancer for dairy cattle. Version 2.02. East Lansing: Michigan State University, 2006.
- AKIN, D. E. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. **Agonomy Journal**, Madison, v. 81, p. 17-25, 1989.
- ALAMOUTI, A. A. et al. Effects of inclusion of neutral detergent soluble fibre sources in diets varying in forage particle size on feed intake, digestive processes, and performance of mid-lactation Holstein cows. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 154, n. 1, p. 9-23, Oct. 2009.
- ALLEN, M. S. Relationship between fermentation acid production in the rumen and requirement of physically effective fiber. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 1598-1624, 1997.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed in-take by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, July 2006.
- AMERICAN NATIONAL STANDARDS INSTITUTE. Method of determining and expressing particle size of chopped forage materials by screening. In: _____. **ASAE standards S424.1**. 40th ed. Saint Joseph, 1993. p. 459-461.

AMETAJ, B. N. et al. Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. **Metabolomics**, Alberta, v. 4, n. 4, p. 583-594, Dec. 2010.

ANDRIC, P. et al. Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I., significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology**, Dickson, v. 8, n. 3, p. 308-324, May 2010.

APPLEMAN, R. D.; ADDIS, D. G. Pelleted hay mixture enables dairy cattle to give more milk with less butterfat. **Dairy Science Abstrs**, Champaign, v. 22, p. 603-612, 1960.

ARMENTANO, L.; PEREIRA, M. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 7, p. 1416-1425, 1997.

ARRIOLA, K. G.; ROMERO, J. J.; ADESOGAN, A. T. Effects of pH and temperature on fibrolytic enzyme activities of various commercial exogenous enzyme preparations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, p. 554, 2011. Supplement 1. Abstract.

ASCHENBACH, J. R. et al. Ruminant nutrition symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 4, p. 1092-1107, Oct. 2011.

BAILEY, K. **Managing income over feed costs**. Agricultural Research and Cooperative Extension, 2009. Disponível em: <<http://pubs.cas.psu.edu/FreePubs/pdfs/ua458.pdf>>. Acesso em: 10 nov. 2013.

BAL, M. A. et al. Crop processing and chop length of corn silage: effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 8, n. 6, p. 1264-1273, June 2000.

BAL, N.; SHAVER, R. Impact of the maturity of corn for use as silage in the diets of dairy cows on intake, digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 2497-2503, 1997.

BALCH, C. C. Proposal to use time spent chewing as an index of the extent to which diets for ruminants possess the physical property of fibrousness characteristics of roughages. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 26, p. 383-392, 1971.

BALCH, C. C. et al. Studies on the secretion of milk of low fat content by cows on diets low in hay and high in concentrates: VI., the effects on the physical and biochemical processes of the reticulo-rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 22, p. 270-283, 1955.

BANSAL, P. et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. **Biotechnology Advances**, New York, v. 27, p. 833-848, 2009.

BARNES, R. F.; NELSON, C. J. Forages and grasslands in a changing world. In: BARNES, R. F.; NELSON, C. J.; MOORE, K. J. (Ed.). **Forages: an introduction to grassland agriculture**. Ames: Blackwell, 2003. p. 3-25.

BEARDSLEY, D. W. Symposium on forage utilization: nutritive value of forages as affected by physical form: part II, beef cattle and sheep studies. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 239-245, 1964.

BEAUCHEMIN, K. A.; COLOMBATTO, D.; MORGAVI, D. P. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 84, n. 1, p. 23-36, Oct. 2004.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Effects of fibrolytic enzyme in corn or barley diets on performance and carcass characteristics of feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 77, p. 645-653, 1997.

BEAUCHEMIN, K. A. et al. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 543-553, Mar. 2000.

BEAUCHEMIN, K. A.; HOLTSHAUSEN, L. Developments in enzyme usage in ruminants. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd ed. Oxfordshire: CAB International, 2010. p. 206-230.

BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 75, p. 641-644, 1995.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, p. 2117-2129, 2005.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of grain source and enzyme additive on site and extent of nutrient digestion on dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 378-390, 1999.

BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 630-643, Feb. 2003.

BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 53, p. 145-155, 1995.

BELYEA, R. L.; MARTZ, F. A.; MBAGAYA, G. A. Effect of particle size of alfalfa hay on intake, digestibility, milk yield, and ruminal cell wall of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 72, n. 4, p. 958-963, Apr. 1989.

BERNARDES, T. F; RÊGO, A. C. Study on the practices of silage production and utilization on Brazilian dairy farms. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 3, p. 1852-1861, Mar. 2015.

BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M. M.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Oxfordshire: CABI International, 2001. p. 11-35.

BLOSSER, T. H. et al. The use of dehydrated forages in dairy cattle rations: II., comparative values of finely ground, chopped and pelleted dehydrated alfalfa as grain replacements for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 35, p. 515-523, 1952.

BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. Fibrolytic enzymes and parity effects on feeding behavior, salivation, and ruminal pH of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 565-575, Feb. 2003.

BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. The proportion of feed to which a fibrolytic enzyme additive is applied affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3420-3429, Dec. 2002.

BRENT, B. E. Relationship of acidosis to other feedlot ailments. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 43, n. 4, p. 930-935, Apr. 1976.

BREUKINK, H. J.; DE RUYTER, T. Abomasal displacement in cattle: influence of concentrates in the ration on fatty acid concentration in ruminal, abomasal and duodenal contents. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 37, p. 1181-1184, 1976.

CASTLE, M. E.; GILL, M. S.; WATSON, J. N. Silage and milk production: a comparison between long, chopped and ground hays as supplements to silage of high digestibility. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 36, p. 91-99, 1981.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial residues. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHALUPA, W. et al. Supplemental corn silage or baled hay for correction of milk fat depressions produced by feeding pellets as the sole forage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, p. 208-216, 1970.

CHENG, K. H. et al. Effect of enzyme treatment or steam-flaking of sorghum grains on lactation and digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, p. 1721-1732, 1995.

COLEMAN, S. W.; MOORE, J. E.; WILSON, J. R. Quality and utilization. In: GRASSES, L. E. et al. (Ed.). **Warm Season (C4)**. Madison: CSSA; SSSA, 2004. p. 267-308.

COLOMBATTO, D. et al. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2628-2638, June 2003a.

COLOMBATTO, D. et al. Use of fibrolytic enzymes to improve the nutritive value of ruminant diets: a biochemical and in vitro rumen degradation assessment. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 107, p. 201-209, 2003b.

COOKE, K. M.; BERNARD, J. K. Effect of kernel processing and theoretical length of cut of corn silage on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 2, p. 310-316, Jan. 2005.

CORNELL NET CARBOHYDRATE AND PROTEIN SYSTEM. **SPARTAN**: spartan ration evaluator/balancer for dairy cattle. Version 2.02. Ithaca: Michigan State University, 2001.

CORREA, C. E. S. et al. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 2, p. 3008-3012, Apr. 2002.

COSTA, F. M. J. et al. Silagem de grãos úmidos de textura dura ou macia em dietas com polpa cítrica em dietas para vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, p. 203-210, 2013.

COUGHLAN, M. P. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, Oxford, v. 3, p. 39-109, 1985.

CHRISTENSEN, D. Enzymes: a new approach to enhancing ruminant rations. **Feed News**, Saskatchewan, v. 2, n. 2, p. 4-5, 1997.

DAWSON, K.; TRICARICO, J. M. The use of exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. In: ANNUAL SYMPOSIUM BIOTECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 15., 1999, Loughborough. **Proceedings...** Loughborough, 1999. p. 303-312.

DEAN, D. B. et al. Effect of method of adding a fibrolytic enzyme to dairy cow diets on feed intake digestibility, milk production, ruminal fermentation, and blood metabolites. **Animal Nutrition and Feed Technology**, Chicago, v. 13, n. 3, p. 287-302, Dec. 2013.

EATON, H. D. et al. Field-cured and field-baled alfalfa hay versus artificially-dried and chopped and pelleted alfalfa hays as a source of carotene and roughage for guernsey and holstein calves. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 35, n. 2, p. 98-105, Feb. 1952.

EINARSON, M. S.; PLAIZIER, J. C.; WITTENBERG, K. M. Effects of barley silage chop length on productivity and rumen conditions of lactating dairy cows fed a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 1, p. 2987-2996, Jan. 2004.

ENSOR, W. L.; SHAW, J. C.; TELLECHEA, H. F. Special diets for the production of low fat milk and more efficient gains in body weight. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, n. 1, p. 189-191, Jan. 1959.

ERDMAN, R. A. et al. Effect of dietary bicarbonate and magnesium oxide on production and physiology in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 6, p. 923-930, June 1980.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 2839-2851, 2007.

EVERT, R. F. **Plant anatomy, meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function, and development.** 3rd ed. Hoboken: J. Wiley, 2006. 522 p.

FALCONER, M. L.; WALLACE, R. J. Variation in proteinase activities in the rumen. **Journal of Applied Microbiology**, Aberdeen, v. 84, p. 377-382, 1998.

FANUTTI, C. et al. The conserved non-catalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, p. 29314-29322, 1995.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Effect of corn shredlage on lactation performance and total tract starch digestibility by dairy cows. **Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 28, p. 639-647, 2012a.

FERRARETTO, L. F.; SHAVER, R. D. Meta-analysis: effect of corn silage harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows. **Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 28, p. 141-149, 2012b.

FERREIRA, G.; MERTENS, D. R. Chemical and physical characteristics of corn silages and their effects of in vitro disappearance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4414-4425, Dec. 2005.

FIRKINS, J. L. et al. Effects of grain processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 1, p. 218-238, Jan. 2001.

FONTES, C. M. G. A. et al. The resistance of cellulases and xylanases to proteolytic inactivation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 43, p. 52-57, 1995.

FRONK, T. J.; SCHULTZ, L. H.; HARDIE, A. R. Effect of dry period over-conditioning on subsequent metabolic disorders and performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 7, p. 1080-1090, July 1980.

GILL, J.; CAMPLING, R. C.; WESTGARTH, D. R. A study of chewing during eating in the cow. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 20, n. 2, p. 13-17, Feb. 1966.

GWAYUMBA, W.; CHRISTENSEN, D. A. The effect of fibrolytic enzymes on protein and carbohydrate degradation fractions in forages. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 77, p. 541-542, 1997.

HAENLEIN, G. F. W.; RICHARDS, C. R.; MITCHELL, W. H. Effect of the size of grind and the level of intake of pelleted alfalfa hay on its nutritive value in cows and sheep. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 45, n. 6, p. 693-700, June 1962.

HANNA W. W.; SOLLENBERGER, L. E. Tropical and subtropical grasses. In: BARNES, R. F. et al. (Ed.). **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames: Blackwell, 2007. p. 245-256.

HATFIELD, R. D. et al. Nutritional chemistry of forages. In: BARNES, C. J. et al. (Ed.). **Forages: the science of grassland agriculture**. Ames: Blackwell, 2007. p. 467-485.

HERRERA-SALDANA, R. E.; HUBER, J. T.; POORE, M. H. Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, p. 2386-2393, 1990.

HOFFMAN, P. C. et al. A query for effective mean particle size in dry and high-moisture corns. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 6, p. 3467-3477, June 2012.

HOPE, E. B. et al. The use of dehydrated forages in dairy cattle rations: I., grain substitution with finely ground- material. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 33, p. 306-314, 1950.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage in vitro and in sacco dry matter degradability. In: WESTERN SECTION MEETING, AMERICAN SOCIETY ANIMAL SCIENCE, 1996, New Mexico. **Proceedings...** New Mexico: State University New Mexico, 1996. p. 282-284.

HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K. J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed and barley grain diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 2, p. 477-487, 2000.

HUFFMAN, C. F. Roughage quality and quantity in the dairy ration: a review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 137, n. 11, p. 889-980, Nov. 1939.

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

JOHNSON, L. Nutritive value of corn silage as affected by maturity and mechanical processing: a contemporary review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 2813-2825, 1999.

JOHNSON, L. M. et al. Corn silage management I: effects of hybrid, maturity, and mechanical processing on chemical and physical characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 4, p. 833-853, Apr. 2002.

JUNG, H. G.; SAMAC, D. A.; SARATH, G. Modifying crops to increase cell wall digestibility. **Plant Science**, Shannon, v. 185/186, n. 4, p. 65-77, Apr. 2012.

JUNG, H. J. G.; ALLEN, M. S. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, p. 2774-2790, 1995.

KENNEDY, P. M.; DOYLE, P. Particle-size reduction by ruminant-effects of cell wall composition. In: JUNG, H. G. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA; CSSA; SSSA, 1993. p. 499-534.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J. The effect of corn silage particle size and cottonseed hulls on cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 7, p. 2438-2451, July 2003.

KONONOFF, P. J.; HEINRICHS, A. J.; BUCKMASTER, D. A. Modification of the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the effects of moisture content on its measurements. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 1858-1863, Feb. 2003.

KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 84-94, Jan. 2008.

KUNG JUNIOR, L. Silage fermentation and additives. In: SCIENCE AND TECHNOLOGY IN THE FEED INDUSTRY, 17., 2001, New York. **Proceedings...** New York, 2001. 1 CD-ROM.

KUNG JUNIOR, L. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 2396-2402, July 2002.

KUNG JUNIOR, L. et al. The effect of treating forages with fibrolytic enzymes on its nutritive value and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 115-122, May 2000.

LAMMERS, B. P.; BUCKMASTER, D. R.; HEINRICHS, A. J. A simple method for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 922-928, 1996.

LATHAM, M. J.; SUTTON, J. D.; SHARPE, M. E. Fermentation and microorganisms in rumen and content of fat in the milk of cows given low roughage rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 57, n. 3, p. 803-810, Mar. 1974.

LEWIS, G. E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a forage-based diet fed to beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, p. 3020-3028, 1996.

LEWIS, G. E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 611-617, 1999.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 4th ed. New York: Freeman, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21709>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

LYNCH, J. P.; BAAH, J.; BEAUCHEMIN, K. A. Conservation, fiber digestibility, and nutritive value of corn harvested at 2 cutting heights and ensiled with fibrolytic enzymes, either alone or with a ferulic acid esterase-producing inoculant. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 8, p. 1-11, Aug. 2015.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MAULFAIR, D. D.; HEINRICHS, A. J. Effects of varying forage particle size and fermentable carbohydrates on feed sorting, ruminal fermentation, and milk and component yields of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 4, p. 3085-3097, Apr. 2013.

MAULFAIR, D. D.; HEINRICHS, A. J. Review: methods to measure forage and diet particle size in the dairy cow. **Professional Animal Scientist**, Illinois, v. 28, n. 9, p. 489-493, Sept. 2012.

MCALLISTER, T. A. et al. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 70, p. 571-579, 1990.

MCALLISTER, T. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Wiltshire: CABI, 2001. p. 273-298.

MELO, L. Q. et al. Rumen morphometrics and the effect of digesta pH and volume on volatile fatty acid absorption. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 1775-1783, Jan. 2013.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting fiber requirements of dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 463-482, 1997.

MILLEN, D. D. et al. A snapshot of management practices and nutritional recommendations used by feedlot nutritionists in Brazil. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 4, p. 3427-3439, Apr. 2009.

MOORE, L. A. Symposium on forage utilization: nutritive value of forage as affected by physical form: part I., general principles involved with ruminants and effect of feeding pelleted or wafered forage to dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 23, p. 230-238, 1964.

MORGAVI, D. P. et al. Resistance of feed enzymes to proteolytic inactivation by rumen microorganisms and gastrointestinal proteases. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1621-1630, June 2001.

MORGAVI, D. P. et al. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *Trichoderma Longibrachiatum*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 6, p. 1310-1321, June 2000.

MUCK, R.; KUNG JUNIOR, L. Effects of silage additives on ensiling. In: SILAGE: FIELD TO FEEDBUNK NORTH AMERICAN CONFERENCE, 1997, Minnetonka. **Proceedings...** Minnetonka: NRAES, 1997. p. 187-199.

MURASHIMA, K.; KOSUGI, A. Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 5, p. 1518-1524, May 2003.

MURDOCK, F. R.; HODGSON, A. S. Effects of roughage type and texture on milk fat by Lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 62, p. 62-69, 1979.

NASROLLAHI, S. M. et al. Grain source and marginal changes in forage particle size modulate digestive processes and nutrient intake of dairy cows. **Animal**, Amsterdam, v. 6, n. 4, p. 1237-1245, Apr. 2012.

NASROLLAHI, S. M.; IMANI, M.; ZEBELI, Q. A meta-analysis and meta-regression of the effect of forage particle size, level, source, and preservation method on feed intake, nutrient digestibility, and performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 4, p. 8926-8939, Apr. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 6th ed. Washington: National Academy Science, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7th ed. Washington: National Academy of Science, 2001. 408 p.

NSEREKO, V. L.; MORGAVI, D. P.; RODE, L. M. Effect of fungal enzyme preparations on hydrolysis and subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganisms in vitro. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 88, p. 153-170, 2000.

OFFINER, D. I. Feed enzymes. In: MELLO, J. P. F. (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. Edinburgh: CABI, 2000. p. 405-426.

PALMQUIST, D. L.; RONNING, M. J. Some effects caused by feeding ground, pelleted hay as compared to feeding long hay to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 44, n. 2, p. 2237-2241, Feb. 1961.

PALOHEIMO, M.; PIRONEN, J.; VEHAMAAANPERÄ, J. Xylanases and cellulases as feed additives. In: BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2nd ed. Oxfordshire: CAB International, 2010. p. 12-53.

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

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, p. 2178-2184, 1998.

PHILIPPEAU, C.; MONREDON, F. D.; MICHALETDOREAU, B. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 238-243, 1999.

PINOS-RODRÍGUEZ, J. M. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3016-3020, Dec. 2002.

POPPI, D. P. et al. Marker concentration patterns of labelled leaf and stem particles in the rumen of cattle grazing Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) analysed by reference to a raft model. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 85, n. 10, p. 553-563, Oct. 2001.

POPPI, D. P.; HENDRICKSEN, R. E.; MINSON, D. J. The relative resistance to escape of leaf and stem particles from the rumen of cattle and sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 105, p. 9-14, 1985.

PORTER, G. H. et al. Relative value for milk production of field-cured and field-baled, artificially dried-chopped, artificially dried-ground and artificially dried-pelleted alfalfa when fed as the sole source of roughage to dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 35, p. 1140-1149, 1953.

POWELL, E. B. Some relations of roughage intake to the composition of milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 22, p. 453-459, 1939.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-deaçúcar**. 2007. 223 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ROBINSON, P. H.; SNIFFEN, C. J.; SOEST, P. J. van. Influence of level of feed intake on digestion and bacterial yield in the fore stomachs of dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 65, n. 3, p. 437-444, Mar. 1985.

RODE, L. M.; BEAUCHEMIN, K. A. **Enzymes to enhance utilization of feed in dairy cows**. Lethbridge: Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, 1998. 336 p.

RODE, L. M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 2121-2126, 1999.

ROMERO, J. J. et al. Adesogan Improving the performance of dairy cattle with a xylanase-rich exogenous enzyme preparation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, 2016. In press.

RONNING, M.; MEYER, J. H.; CLARK, G. T. Pelleted alfalfa hay for milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 42, p. 1373-1376, 1959.

RUSSELL, J. B.; WILSON, D. B. Why are cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 1503-1509, 1996.

SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A.; TREACHER, R. J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 996-1003, 1999.

SHEPERD, A. C.; KUNG JUNIOR, L. An enzyme additive for corn silage: effects on silage composition and animal performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, p. 1760-1766, 1996.

SHINNERS, K. J. et al. Processing whole-plant corn silage with crop processing rolls on a pull-type forage harvester. **Applied Engineering in Agriculture**, Saint Joseph, v. 16, n. 2, p. 323-331, Feb. 2000.

SOEST, P. J. van. Forage intake in relation to chemical composition and digestibility: I., some new concepts. In: SOUTHERN PASTURE FORAGE CROP IMPROVEMENT CONFERENCE, 23., 1966, Blacksburg. **Proceedings...** Blacksburg, 1966. p. 24.

SOEST, P. J. van. **Interrelationships between composition and physical condition of feeds, rumen fermentation products, blood constituents and milk fat of ruminants**. 1955. 442 p. Thesis (Ph.D. in Animal Science) - University Wisconsin, Madison, 1955.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 337 p.

SUDWEEKS, E. M.; ELY, L. O.; SISK, L. R. Effect of intake on chewing activity of steers. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, p. 152-163, 1980.

SUTHERLAND, T. M. Particle separation in the forestomachs of sheep. In: DOBSON, A.; DOBSON, M. J. (Ed.). **Aspects of digestive physiology in ruminants**. Ithaca: Cornell University Press, 1988. p. 43-73.

SUTTON, J. D. et al. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 5, p. 546-556, May 2003.

TAF AJ, M. et al. Digesta characteristics of dorsal, middle and ventral rumen of cows fed with different hay qualities and concentrations levels. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 58, n. 9, p. 325-342, Sept. 2004.

TAF AJ, M. et al. Effects of fiber concentration of diets consisting of hay and slowly degradable concentrate on the fermentation patterns and digesta particle size in the rumen of mid-lactation dairy cows. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 60, n. 3, p. 254-266, Mar. 2006.

TEIMOURI YANSARI, A. et al. Effects of alfalfa particle size and specific gravity on chewing activity, digestibility, and performance of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 3912-3924, July 2004.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E. Quantitative analysis of cell wall components. In: JUNG, H. G. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, 1993. p. 83-104.

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

THOMAS, P. C. Diet and milk secretion in the ruminant. **World Review of Animal Production**, Rome, v. 11, p. 33-39, 1975.

VICINI, J. L. et al. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, p. 576-585, 2003.

VOSKUIL, G. C. J.; METZ, J. H. M. The effect of chopped hay on feed intake, rate of eating and rumination of dairy cows. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, Amsterdam, v. 21, p. 256-264, 1973.

WANG, Y.; MCALLISTER, T. A. Rumen microbes, enzymes and feed digestion-a review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 15, n. 1, p. 1659-1676, Jan. 2002.

WEIMER, P. J. et al. Fermentation of a bacterial cellulose/xylan composite by mixed ruminal microflora: Implications for the role of polysaccharide matrix interactions in plant cell wall biodegradability. **Journal of the Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 1, p. 727-1733, Jan. 2000.

WEISS, W. P.; WYATT, D. J. Effect of oil content and kernel processing of corn silage on digestibility and milk production by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 351-358, July 2000.

WIERSMA, D. W. et al. Kernel milkline state and corn forage yield, quality, and dry matter content. **Journal Produce Agricultural**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 94-99, 1993.

WILSON, J. R.; KENNEDY, P. M. Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fiber characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 47, p. 199-225, 1996.

WITHERS, S.; WILLIAMS, S. **Glycoside hydrolases in CAZypedia**. Disponível em: <<http://www.cazypedia.org/>>. Acesso em: 1 out. 2013.

WITZIG, M. **Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluss der Grobfutterquelle und Futterpartikelgröße auf die ruminale Mikroorganismenmenge in vivo**. 2009. Thesis (Ph.D.) - Martin-Luther-Universität, Halle, 2009.

WOOD, T. M.; BHAT, K. M. Methods for measuring cellulose activities. **Methods in Enzymology**, New York, v. 160, p. 87-112, 1988.

WOODMAN, H. E.; BEE, J. W.; GRIFFITH, G. Nutritive value of pasture: V., pasture grass conservation: the influence of artificial drying on the digestibility of pasture herbage. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 20, p. 53-62, 1930.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: chewing and ruminal pH. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 11, p. 2826-2838, Nov. 2007a.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: digestion and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 3410-3421, Aug. 2007b.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of physically effective fiber on chewing activity and ruminal pH of dairy cows fed diets based on barley silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 217-228, 2006.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Effects of physically effective fiber on digestion and milk production by dairy cows fed diets based on corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 11, p. 1090-1098, Nov. 2005.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. A comparison of methods of adding fibrolytic enzymes to lactating cow diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 2512-2520, Feb. 2000.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M. Effects of an enzyme feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, p. 391-403, 1999.

ZEBELI, Q. et al. Effects of dietary forage particle size and concentrate level on fermentation profile, in vitro degradation characteristics and concentration of liquid- or solid-associated bacterial mass in the rumen of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 140, n. 5, p. 307-325, May 2008.

ZEBELI, Q. et al. Effects of dietary hay particle size and concentrate level on chewing activity, ruminal mat characteristics and passage in dairy cows fed restricted. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, p. 1929-1942, 2007.

ZEBELI, Q. et al. Invited review: role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 1041-1056, Mar. 2012.

ZEBELI, Q. et al. A statistical model to optimize the requirements of lactating dairy cows for physically effective neutral detergent fibre. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 64, n. 5, p. 265-278, May 2010.

ZWALD, A. et al. Technical note: a near-infrared reflectance spectroscopy technique to predict particle size of starch within corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 8, p. 2071-2076, Aug. 2008.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - RESPONSE OF LACTATING DAIRY COWS TO CORN
SILAGE DIFFERING IN MECHANICAL PROCESSING AND
FIBROLYTIC ENZYME SUPPLEMENTATION**

**Artigo formatado de acordo com a norma para submissão do Journal of
Dairy Science.**

ABSTRACT

1
2 The objectives of these two experiments were to determine the effects of
3 corn silage particle length and supplementation of fibrolytic enzyme on
4 digestion and lactation performance of dairy cows. A preliminary experiment
5 was conducted to evaluate different processing of corn silage harvested using a
6 pull-type forage harvester. From this evaluation we selected the treatments for
7 the production experiment. In the production experiment, sixteen Holsteins (4
8 primiparous; 110 ± 60 DIM; 695 ± 95 kg) formed 4 blocks of cows, based on
9 calving order and milk yield, and were assigned to a sequence of 4 treatments (2
10 x 2 factorial) in replicated 4×4 Latin Squares, with 28-d periods, and 21 d of
11 adaptation to treatments. The main factors were: corn silage with short particle
12 length-no processor (SHORT, 3 mm mesh) vs. long particle length-processor
13 (LONG, 8.5 mm mesh) and supplementation (FIB) or no supplementation
14 (NOFIB) with fibrolytic enzymes. Diets contained 31.6% of DM as the
15 treatment corn silage, 17.1% of a standard corn silage, and 1.9% Tifton hay as
16 forage sources. Diet SHORT had 1.9% of DM as NDF above the 19 mm
17 diameter sieve of the Penn State separator, 12.3% of DM from 8 to 19 mm, and
18 17.8% of DM below the 8 mm sieve. Diet LONG had 3.0%, 15.6%, and 13.9%
19 of DM at the same sieves, respectively. Diet LONG increased 4% FCM (29.5 vs.
20 28.2 kg/d) and fat yield, tended to increase ECM (31.0 vs. 29.7 kg/d), and had
21 no impact on DMI (22.0 kg/d). Diet LONG tended to increase chews/bolus and

22 to reduce the duration of the first daily meal, and significantly increased
23 chewing activity per d and per kg of DMI. Diet SHORT reduced ruminal fluid
24 pH in agreement with reduced chewing activity. There was a decrease in milk fat
25 concentration and yield in response to FIB, but no interaction with corn silage
26 particle size. Diet FIB increased the digestibility of OM and NDF in SHORT
27 but not LONG. In addition, SHORT had reduced starch digestibility compared
28 to LONG. The daily urinary allantoin secretion was increased FIB was
29 supplemented to SHORT which may indicate an increase in microbial synthesis.
30 Additionally, FIB decreased PUN which supports a possible increase in
31 microbial synthesis. Although visible damaged corn kernels in feces were
32 reduced by FIB, excretion of intact kernels was similar. Corn silage LONG
33 improved lactation performance and chewing activity whereas the effects of FIB
34 were minimal.

35 **Key words:** digestibility, cellulase, fiber, particle size, physically effective NDF,
36 starch.

37

38

39

INTRODUCTION

40 Whole-plant corn silage (**WPCS**) is a high-energy, high-DM yield
41 forage comprised of kernel and stover fractions, rich in starch and NDF,
42 respectively. A crucial objective during WPCS harvest is to obtain the maximum
43 processing of kernels, in order to optimize starch digestibility (Bal et al., 2000;
44 Ferraretto and Shaver, 2012), while simultaneously maintaining sufficient
45 particle size of the stover fraction, to sustain proper ruminal function
46 (Beauchemin and Yang, 2005). In South America, and more specifically in
47 Brazil, one-line, pull-type forage harvesters (**PTFH**) are the predominant
48 equipment for harvesting WPCS (Bernardes and Rêgo, 2014). This type of
49 equipment is of relative low cost and effective for small-scale dairy farming,
50 especially in hilly areas. Due to the lack of a kernel processing system in PTFH,
51 kernel breakage is achieved by reducing the theoretical length of cut (**TLOC**).
52 However, reduction of TLOC also reduces stover fraction particle size and
53 forage physically effective NDF (**peNDF**) concentration (Armentano and
54 Pereira, 1997; Zebeli et al. 2012). Reduction in TLOC to obtain kernel
55 processing is even more necessary when plant maturity increases grain hardness,
56 since Brazilian hybrids are predominantly vitreous type endosperm (Correa et al,
57 2002). Low dietary peNDF concentration has been shown to reduce ruminal
58 motility, chewing activity, saliva production, and rumen mat formation (Zebeli
59 et al., 2012), and can reduce productivity and longevity of dairy cows (Krause

60 and Oetzel, 2005). Forage harvesters that provide adequate kernel breakage,
61 while maintaining long stover particle length, are desirable for formulating diets
62 with high concentration of WPCS for high producing dairy cows (Ferraretto and
63 Shaver, 2012).

64 The low ruminal digestibility of cellulose and hemicellulose in forage cell
65 walls can induce low digestible DM intake in ruminants (Adesogan et al., 2014).
66 Reports on exogenous fibrolytic enzymes supplementation, primarily xylanases
67 and cellulases, suggest that improved forage digestibility and lactation
68 performance are plausible responses to this group of feed additives (Colombatto
69 et al., 2003; Adesogan et al., 2005). Furthermore, improvement in performance
70 appears to be mainly the result of improved ruminal fiber digestibility
71 (Phakachoed et al., 2013) and feed conversion efficiency (Zebeli et al., 2008b).
72 However, the efficacy and magnitude of lactation response to fibrolytic enzymes
73 supplementation varies, seemingly the result of differences in product, dosage,
74 type of forage and diet, method of supplementation, and cow productivity
75 (Beauchemin et al., 2003, Adesogan et al., 2014).

76 The objectives of these experiments were to: 1) evaluate corn silage stover
77 and kernel fractions processing in response to PTFH harvesting differing in
78 TLOC and kernel processor usage; and 2) evaluate lactation performance,
79 intake, ruminal fermentation, and total tract nutrient digestibility of dairy cows

80 in response to WPCS differing in TLOC and supplementation or not of a blend
81 of fibrolytic enzymes.

82 MATERIALS AND METHODS

83 Experiment 1

84 A corn hybrid (Dow 2B587Hx, Dow AgroSciences Industrial, São Paulo,
85 Brazil) was harvested at the half milk line stage of maturity (36.4% of DM) on
86 March 4th, 2012. The concentrations of NDF and starch in whole-plant were
87 52.1% and 30.0% of DM, respectively. Harvesting was performed with a PTFH
88 (Pecus 9004, Generation 4, 10 knives, Nogueira Máquinas Agrícolas, Itapira,
89 Brazil) set to 3, 4.5, 6, or 8.5 mm TLOC, factorialized without (**noKP**) or with
90 the usage (**KP**) of a kernel processor. The PTFH kernel processor was a curved-
91 disc with circular recesses for kernel retention, fixed next to the knives and
92 hammers at the base of the harvester's cabinet (Freitas, 2010). Experimental
93 units were four 50 m long corn rows randomly harvested from two rows
94 cultivated 60 cm apart in the field (N = 32).

95 From each load of harvested forage corn, six 500 g samples were obtained
96 to evaluate the proportion of fresh forage, DM, NDF, and starch retained on the
97 19 mm and 8 mm diameter pore sieves of the Penn State Particle Separator
98 (**PSPS**; Heinrichs and Kononoff, 2009) and the bottom pan. Samples were dried
99 in forced-air oven at 55°C for 72 h and ground through a 1-mm mesh diameter
100 screen with a Thomas-Willey mill (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA). The

101 absolute DM concentration was determined by drying at 100°C for 24 h. The ash
102 free NDF was determined by filtering in crucibles, with α -amylase and sodium
103 sulfite (Van Soest et al., 1991). Starch was analyzed enzymatically as in Hall
104 (2009).

105 Visible kernels and cobs were manually separated from 500 g forage corn
106 samples by two evaluators. Four samples were evaluated per experimental unit
107 and the mean value was used for statistical analysis. Visible kernels were
108 classified as intact (I), damaged (D), or extremely damaged (ED). Damaged
109 kernels had the endosperm not covered by pericarp around the tip of the grain,
110 while ED kernels had the pericarp not covering one face of the seed endosperm.
111 Cobs were classified as whole or broken (a quarter to a third of a cob circular
112 section). Whole cobs had the circular section intact. No kernel was attached to
113 visible cob particles.

114 Ruminal *in situ* DM degradability of I, D, and ED kernels was evaluated
115 using two ruminally-cannulated, midlactation, multiparous Holstein cows fed a
116 TMR containing (DM basis) nonexperimental corn silage (65.5%), tifton hay
117 (5.5%), and concentrate mixture (29%). Fresh kernels (5 g) were incubated in
118 triplicate on each cow with polyester bags (10 × 20 cm and 53 ± 5 μ m pore size;
119 company and address). Incubation times were 12, 30, and 72 h. Bags were
120 moistened in warm water for 30 s before incubation. Each laundry bag contained
121 a blank bag to allow correction for infiltration of DM into sample bags.

122 Following ruminal incubation, bags were soaked in cold water for 15 min and
123 washed twice in a washing machine (12-minute rinse cycle with cold water).
124 Kernels and bags with incubation residues were dried in a forced-air oven at
125 55°C for 72 h. The DM disappearance in 12 h and 30 h and the residue of the 72
126 h incubation were calculated (% of DM).

127 Data was analyzed with PROC MIXED of SAS (SAS Institute, 2004)
128 with a model containing the fixed effects of kernel processor (KP, noKP),
129 TLOC (3 mm, 4.5 mm, 6 mm, 8.5 mm) and the interaction of kernel processor
130 and TLOC. Three pre-planned contrasts compared TLOC: 3 mm vs. 4.5 mm
131 (C1), 4.5 mm vs. 6 mm (C2), and 6 mm vs. 8.5 mm (C3). Kernels *in situ* DM
132 degradation used the incubated bags as the experimental unit (6/treatment) to
133 evaluate the effect of kernel damage (I, D, ED) and means were compared with
134 the Bonferroni's test. Linear.

135 Regressions to determine linear and quadratic relationships
136 between particle size distributions in the PSPS compartments were
137 performed using PROC REG of SAS (SAS Institute, 2004) and used to
138 study the variation in proportions among different TLOCs tested on trials.
139 Best-fit regression (linear or quadratic) was chosen using the highest
140 coefficient of determination (R^2) and lowest root mean square error
141 (**RMSE**) as indicators.

142 **Experiment 2**

143 The experiment was conducted from July 15th to October 4th, 2013, in a
144 sand bedded tie-stall barn with fans and high pressure sprinklers at the Better
145 Nature Research Center, located at Ijaci, MG, Brazil
146 (<http://www.holandesflamma.com.br/index.php/en/>). The protocol was approved
147 by the University of Lavras Bioethic Committee in Utilization of Animals
148 (Protocol n° 037/13). The barn was located at 846 m of altitude, 21° 09' 52.41''
149 latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west. Corn silages differing in
150 TLOC and kernel processing were harvested from the same field of a corn
151 hybrid (Dow 2B587HxD, Dow AgroSciences Industrial Ltda, São Paulo, Brazil)
152 cultivated at the experimental station. Plants were harvested at the half milk line
153 stage of maturity (106 d after seeding and 33% DM) with a PTFH (Pecus 9004,
154 Generation 4, 10 knives. Nogueira Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista,
155 Brazil). Long (**LONG**) and Short (**SHORT**) TLOC WPCS were generated:

156 SHORT was harvested at 3.0 mm TLOC without the use of a kernel processor
157 (most common practice in Brazil) and LONG was harvested at 8.5 mm TLOC
158 using a kernel processor (long fiber and kernel damage based on Experiment 1
159 results).

160 The rate of harvesting was calculated by chronometry and weighting of
161 six wagonloads of silage. Approximately 35 ton of each forage was ensiled in a
162 day, in 1.8 m diameter by 30 m long silo bags (Ip Bags, Ipesa Ltda, São Paulo,
163 Brazil). Silos were unloaded 138 d after ensiling, 2 d before the start of the
164 feeding trial. Silage density was measured weekly during the experiment (Muck
165 and Holmes, 2006) from duplicate samples obtained at the top, center, and
166 bottom of the silage panel with a 46 mm diameter, 227 mm long probe attached
167 to a drill.

168 Sixteen individually fed Holsteins (110 ± 62 DIM) formed 4 squares of
169 cows based on calving order (12 multiparous and 4 primiparous) and milk yield.
170 Within each square, cows were randomly assigned to a sequence of treatments
171 in 4 x 4 Latin Squares, conducted simultaneously, and balanced for carry-over
172 effects. Periods were 21 d with 14 d of adaptation to treatments. Treatments
173 were formed by a 2 x 2 factorial arrangement of SHORT or LONG,
174 supplemented (FIB) or not supplemented (NOFIB) with a blend of fibrolytic
175 enzymes added to a slow release nitrogen source as carrier (Optimase).
176 Optimase contained exogenous fibrolytic enzymes (Fibrozyme, Alltech Inc.,

177 Araucária, Brazil) and slow release urea. A slow release urea product from the
178 same company (Optigen) was used as control (NOFIB). The enzyme
179 preparation was derived from *Aspergillus niger* and *Trichoderma*
180 *longibrachiatum* fermentation extracts, containing endoglucanase,
181 exoglucanase, and xylanase activities. The enzyme activity at pH 6.5 and 39°C
182 was determined according to Colombatto et al. (2003). Solutions containing (10
183 g/L) of carboxymethylcellulose, Avicel PH-101, oat spelt xylan, and soluble
184 starch were used as substrates to determine endoglucanase, exoglucanase,
185 xylanase, and amylase activities, respectively. The enzyme was dissolved in 1
186 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5; 1 g of enzyme/L). The enzyme
187 preparation (80 µl) was incubated in triplicate with 8 mL substrate solution for
188 15, 120, 5, and 10 min to detect endoglucanase, exoglucanase, xylanase, and
189 amylase activities, respectively. Optimase (1 g/L) released 100 µmol of glucose
190 from carboxymethylcellulose and 422 µmol of xylose from oat spelt xylan per
191 minute, and no exoglucanase and amylase activities were detected.

192 Weekly samples of SHORT and LONG were collected immediately
193 before TMR mixing to monitor chemical composition, pH, and fermentation
194 profile. Water extracts of silages were prepared by homogenizing 25 g of plant
195 material and 225 mL of one-fourth strength Ringer's solution for 1 min with an
196 industrial blender (Skymesen, model TA-02, Brusque, Brazil). The water extract
197 was filtered through a double layer of cheesecloth for pH determination. A

198 portion of the aqueous extract (2 mL) was acidified with 10 μ L of 50 % (v/v)
199 H_2SO_4 and frozen for analysis of short-chain organic acids and ethanol by
200 HPLC, as described by Muck and Dickerson (1988). The corn silage processing
201 score (**CSPS**, % of starch passing through a 4.75 mm diameter sieve) was
202 determined according to Ferreira and Mertens (2005). The geometric mean
203 particle size (**GMPS**) was calculated on an as-fed and DM basis according to
204 Kononoff and Heinrichs (2002).

205 Feed offered and refusals from each cow were weighed daily throughout
206 the experiment. On week 3, samples of feed ingredients, TMRs, and refusals per
207 cow were collected daily, frozen, and composite samples were formed by
208 period. The composition of the consumed TMR was calculated based on the
209 composition of ingredients and orts by cow. The TMRs were mixed and offered
210 twice per day at 7 am and 1 pm. Silo unloading and TMR mixing was
211 performed manually to maintain silage TLOC. The DM concentration of forages
212 was analyzed three times per week with a Koster Moisture Tester (Koster Crop
213 Tester Inc., Brunswick, OH) to maintain diet adequacy. Composite samples by
214 period were dried in forced-air oven at 55°C for 72 h and ground through a 1-
215 mm mesh diameter screen with a Thomas-Willey mill. The absolute DM, ash-
216 free NDF, and starch concentration were determined as in Experiment 1. The
217 concentration of CP was determined by micro-Kjeldahl analysis (method
218 990.03; AOAC International, 2012), ether extract by method 2003.05 and ADF

219 by method 978.10 of AOAC International (2006), and ash by incineration at
220 550°C for 8 h.

221 Cows were milked twice per d starting at 400 and 1600 h. Milk samples
222 from 6 consecutive milkings were obtained (d 16, 17, and 18). Milk components
223 were measured at the Paraná State Holstein Association Laboratory (Laboratório
224 Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça
225 Holandesa, Curitiba, Brazil) by infrared analysis (Bentley 2000, Bentley
226 Instruments Inc., Chaska, MN). After analysis, samples were mathematically
227 composited by d in proportion to the milk produced in each milking. Milk
228 energy secretion (**Milk E**; Mcal/d) was calculated as $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547$
229 $\times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$ (NRC, 2001). The ECM was
230 calculated as: $\text{Milk E}/0.70$ (Assumes 0.70 Mcal/kg for milk with 3.7% fat, 3.2%
231 protein, and 4.6% lactose). The 4% FCM was calculated as: $(0.4 + 15 \times \% \text{ fat} /$
232 $100) \times \text{kg of milk}$ (NRC, 2001).

233 Total tract apparent digestibility of DM, OM, NDF, starch, and non-NDF
234 OM was determined on d 19 to 21 by total collection of feces in buckets by
235 trained personnel. Feces were collected concurrent to defecation during three 8-h
236 sampling periods and weighed. The second and third sampling periods began 8 h
237 later than the previous sampling, to avoid a major disturbance to the animals
238 while still representing a 24-h collection period. Fecal aliquots (equal fresh
239 weight basis) were taken from each defecation and divided into 4 sub-samples.

240 The first sub-sample was used to measure fecal pH in a solution of 20 g feces
241 and 20 mL of distilled water (Digimed pH Meter, Model DM20, Analytical
242 Instrumentation Digimed Ltda. São Paulo, Brazil). The second sub-sample was
243 immediately frozen, dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h, ground to pass
244 through a 1-mm screen, and analyzed for DM, NDF, and ash as previously
245 described. The daily intake of digestible organic matter (**DOMI**) was calculated
246 to estimate energy intake. The efficiency of energy usage was defined as the
247 ratio of ECM to DOMI.

248 The third fecal sub-sample was used to measure viscosity by an adaptation
249 of the methodology of Cannon et al. (2010). Samples of 100g of fresh feces were
250 diluted in 130 mL of water; the solution was gently homogenized with a metal
251 spatula for 30 s, and strained through a double layered cheese cloth. Viscosity
252 was measured in three 60 mL aliquots of the filtered solution in a 100 mL, 5 cm
253 diameter beaker with a digital Brookfield viscometer (LV-DV-II) with a
254 Wells/Brookfield LV spindle (LV-1; n° 61). Constants and configurations were
255 programmed into Wingather software (Brookfield Engineering) for viscosity
256 calculations. Viscosity was calculated as a function of rpm over an rpm range of
257 10, 12, 20, 30, 40, 60, and 100 rpm with the temperature set at 24°C. The range
258 of rotational frequencies was chosen such that the measured torque was well
259 above the minimum measurable (between 10 and 100 m² * kg/s²). The data used
260 for the statistical analysis were obtained from the 20 rpm due to lower variation

261 of the samples tested and was expressed in centipoise (1cP = 1mPa.s on the
262 international system of units).

263 The fecal excretion of visually detectable intact and damaged corn kernels
264 was evaluated in a fourth sub-sample of feces. Feces were washed with tap water
265 to separate material retained on a 4 mm diameter sieve. Retained corn kernels
266 were manually collected. Kernels were classified as damaged (E + ED) or intact
267 and expressed as the number and mass per unit of feces. Intact and damaged
268 kernels in silages Standard, SHORT, and LONG were measured to calculate
269 visible kernels intake as the kernel concentration in silage multiplied by silage
270 intake.

271 Total urinary output was collected in buckets, concurrent to fecal
272 sampling, to estimate rumen microbial synthesis based on purine derivative
273 excretion. A 20% sulfuric acid solution was immediately added to the urine
274 samples (1:20) before refrigeration at 4°C. A composite urine sample was
275 formed per cow per period, diluted with a 4% sulfuric acid solution (1:5), and
276 frozen at -20°C until analysis of allantoin concentration (Chen and Gomes,
277 1992).

278 Chewing activity was measured on d 15 and 17 by observation of buccal
279 activity of each cow at 5 min intervals for 24 h. Buccal activities recorded were:
280 water ingestion, feed ingestion, rumination, and idleness. Chewing time, in min
281 per d, was the sum of ingestion and rumination time. Chewing, ingestion, and

282 rumination per unit of DMI were calculated using the DMI during the days of
283 chewing evaluation. The duration of the first daily meal was measured with a
284 chronometer and chews per bolus was calculated by counting chews of five
285 rumination boluses in the morning.

286 On d 15, blood samples from the coccygeal vessels were obtained to
287 determine plasma urea-N (**PUN**). Samples were obtained immediately before
288 the first daily feeding and 1, 2, 3, 6, 9, 12, and 18 h after feeding. The blood,
289 collected in vacutainer tubes containing EDTA, was immediately refrigerated,
290 centrifuged at 1,500 x g for 15 min, and the plasma was frozen. The PUN
291 concentration was analyzed with a laboratory kit (Labtest Diagnóstica SA,
292 Lagoa Santa, Brazil). Plasma glucose concentration 12 h post-feeding was also
293 analyzed with a laboratory kit (Dols Reagentes e Equipamentos para
294 Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil).

295 The particle size distribution of TMRs and silages SHORT and LONG
296 were measured on duplicate samples obtained on d 16 and 18. Particles retained
297 on sieves with 1.18, 9, and 19 mm diagonals of the PSPS were recorded on as
298 fed and DM basis. The NDF concentration of each feed fraction was analyzed to
299 calculate the physically effective NDF greater than 8 mm ($\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}}$) and
300 greater than 1.18 mm ($\text{peNDF}_{>1.18\text{-NDF}}$).

301 Feed sorting behavior was evaluated on d 16 and 18 according to Leonardi
302 and Armentano (2003), using 2 sieves (19 and 8 mm) and the bottom pan of the

303 PSPS. Values equal to 100% indicate no sorting, values greater than 100%
304 indicate preferential consumption (sorting in favor), and values smaller than 100
305 indicate refusal (sorting against). The proportions of daily DMI from 7 am to 1
306 pm, from 1 pm to 7 pm, and from 7 pm to 7 am were measured by sampling and
307 weighting feeds and orts per cow. The refusal of each cow at 1 pm was mixed
308 with the feed offered at 1 pm. The refusal at 7 pm was assumed to be the diet
309 offered for the next sampling period (7 pm to 7 am).

310 On d 21, rumen fluid samples were collected through a flexible oro-gastric
311 tube 9 ± 0.6 h after the morning feeding. Animals were randomly sampled
312 within square. Approximately 500 mL of ruminal fluid was collected, after
313 discarding approximately 300 mL. The fluid was filtered through 2 layers of
314 cheesecloth and pH was measured immediately with an electrode (Accumet pH
315 meter, model HP-71, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). Total protozoa count
316 was performed according to the recommendations of Dehority (1984) and
317 Warner (1962). A rumen fluid sample was instantaneously frozen in liquid
318 nitrogen to suppress fermentation and was kept frozen until preparation for
319 analysis of VFA by HPLC (LC-10Ai, Shimadzu Corp., Tokyo, Japan). An ion
320 exclusion column from Shimadzu (Shim-pack SCR-101H; 7.9 mm i.d., 100 cm
321 long) operated at 50°C was used for the chromatographic separation. The mobile
322 phase consisted of 100 mM perchloric acid solution with a flow rate of 0.6
323 mL/min. The VFA were detected by UV absorbance (210 nm).

324 Data was analyzed with PROC MIXED of SAS (SAS Institute, 2004)
325 with a model containing the random effect of cow (1 to 16) and the fixed effects
326 of period (1 to 4), TLOC (SHORT, LONG), enzyme (FIB, NOFIB), and the
327 interaction of TLOC and enzyme. When the interaction of TLOC and enzyme
328 was significant at $P < 0.10$, treatment means were compared with Bonferroni's
329 test. The concentration of PUN over time was analyzed as repeated measures
330 over time with the previous model added of the fixed effect of sampling time (0,
331 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18 h) and its two and three term interactions with TLOC and
332 enzyme. The mean square for the interaction of period, cow, TLOC, and
333 enzyme tested the effects of TLOC, enzyme, and their interaction. The best
334 covariance structure was defined by the Akaike information criterion among
335 first order auto regressive, unstructured, and compound symmetry. The slice
336 command of SAS was used to detect differences among means at specific
337 sampling time points.

338 RESULTS

339 Experiment 1

340 Damaged and I kernels had similar DM degradation after 12 and 30 h of
341 ruminal incubation, and ED kernels were more degraded in the rumen (Table 1).
342 Digestibility of DM in corn kernels is strongly related to starch digestibility
343 (Philippeau and Michalet-Doreau, 1999), and thus served as a proxy for starch
344 digestibility in the present study. Partially damaged kernels were more

345 degradable than I kernels only when ruminal incubation was extended to 72 h (P
346 = 0.04). Achieving large exposure of the endosperm was desirable to maximize
347 the ruminal degradation of non-ensiled corn kernels at the half milk line stage of
348 maturity.

349 The use of KP reduced the proportion of visible corn kernels in forage
350 corn and reduced the increase in the concentration of I and D kernels with
351 increased TLOC (Table 2). Forage corn harvested at 8.5 mm and KP had similar
352 proportion of I and D kernels as corn harvested at 3 mm and noKP. The use of
353 KP increased the proportion of fresh forage below the 8 mm sieve of the PSPS,
354 as well as the proportion of the starch in that same feed fraction, but the
355 reduction in NDF particle size was not as accentuated. Reduction in TLOC with
356 noKP was not an effective strategy to increase the proportion of starch in the
357 bottom pan of the PSPS, however, the lowering of TLOC reduced NDF particle
358 size. The use of KP reduced the concentration of NDF and increased the
359 concentration of starch in the small particles feed fraction, more when the
360 harvester was regulated to achieve short TLOC. Increasing TLOC from 6 to 8.5
361 mm was not detrimental to grain damage and slightly increased the proportion of
362 NDF above the 8 mm sieve. Harvesting forage corn with PTFH regulated at 8.5
363 mm TLOC and KP increased NDF particle size and grain damage compared to
364 harvesting at 3 mm and noKP ($P < 0.01$). Each feed fraction of the 19 and 8 mm
365 sieves of the PSPS did not have uniform concentration of NDF and starch.

Experiment 2

Forage corn harvested at 8 mm TLOC and KP (LONG) had 25.0% of fresh forage below the 8 mm sieve of the PSPS and SHORT (3 mm-noKP) had 44.7% (Table 3). The proportion of feed particles below the 1.18 mm sieve was similar. The $\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}}$ concentration was increased from 37.8 to 45.1% of silage DM when the harvester was regulated for longer NDF, the direction of the GMPS response to harvester set up had a similar trend. However, the concentration of $\text{peNDF}_{>1.18\text{-NDF}}$ was not sensitive to variation in harvester regulation (50.1 % of DM for silages SHORT and LONG). Diets containing 32% of DM as the treatment WPCS had concentration of $\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}}$ in DM of 18.7% for LONG and 14.3% for SHORT, but the concentration of $\text{peNDF}_{>1.18\text{-NDF}}$ differed only by 0.6% DM units (Mean value of 30.5% of DM) (Table 4). The concentrations of NDF in WPCS above the 19 mm sieve and between 8 and 19 mm were more responsive to variation in forage processing than the concentration of NDF below 1.18 mm (Table 3). The usage of KP increased silage CSPPS, in spite of the longer TLOC (Table 3), suggesting an improved damage of kernels. The rate of harvesting was numerically faster and silage density was lower for LONG compared to SHORT, but silages fermentation profile were similar and descriptive of well-preserved forages.

Variation in WPCS and diet particle size had no effect on DMI ($P > 0.15$), but longer particles increased energy- and fat-corrected milk yield, with

387 no impact on actual milk yield (Table 5). Daily milk fat secretion was the main
388 driver for increased lactation performance in response to the LONG diet. Feed
389 efficiency was unaffected by treatments ($P = .$). Fibrolytic enzyme
390 supplementation had no impact on DMI and lactation performance, although
391 there was a weak trend for the enzyme to reduce milk yield when it was
392 supplemented to SHORT and to increase yield when it was supplemented to
393 LONG ($P = 0.11$ for the interaction of PS and FB) diets. Response in MUN
394 approached a similar trend for the interaction of PS and FB, but in the opposite
395 direction of the milk yield response. There were also weak trends ($P = 0.12$) for
396 fibrolytic enzyme supplementation do reduce milk fat concentration and fat
397 yield.

398 Chewing activity per day and per unit of DMI were increased by LONG
399 (Table 6). There were trends for increased duration of the first daily meal ($P =$
400 0.08) and a weak trend for decreased ingestion rate throughout the day ($P =$
401 0.12) in response to LONG. Cows also tended to express more chewing per
402 ruminated bolus when diet LONG was fed ($P = 0.10$) compared with SHORT.
403 Fibrolytic enzyme supplementation did not affect ingestion and rumination
404 behavior ($P > 0.15$).

405 The response to treatments in feed sorting behavior differed among
406 periods of the day, although refusal of long feed particles (> 19 mm) and a lower
407 degree of sorting for particles below the 19 mm sieve were observed in all

408 treatments and periods of the day (Table 7). Treatments had no effect on sorting
409 behavior measured from 7 am to 1 pm. Interactions between PS and FB ($P <$
410 0.05) were observed for the sorting behavior of particles below the 19 mm sieve
411 in the afternoon and at night. During these periods of the day, FIB
412 supplementation to diet SHORT induced sorting in favor of particles in the
413 bottom pan of the PSPS. However, at night, FIB supplementation to diet LONG
414 induced refusal of particles in the bottom pan and preferential consumption of
415 particles between the 8 and 19 mm sieve.

416 The larger particle size of diet LONG increased ruminal fluid pH (6.70
417 vs. 6.47), decreased the proportion of butyrate (14.3 vs. 15.8% of VFA), and
418 decreased protozoa concentration (18.9 vs. $23.5 \times 10^4/\text{mL}$) (Table 8). A trend (P
419 = 0.09) for increased proportion of acetate in VFA was also observed in
420 response to LONG, although no difference was detected in the ratio of acetate to
421 propionate. Fibrolytic enzyme supplementation increased the proportion of
422 butyrate in rumen fluid from 14.1 to 15.9% of VFA.

423 Total tract apparent digestibilities of DM, OM, and NDF were lowest
424 for treatment SHORT-NOFIB (Table 9). Fibrolytic enzymes had a positive
425 effect on NDF digestibility only when supplemented to diet SHORT, resulting in
426 digestibility coefficient for SHORT-FIB similar to the digestibility coefficients
427 of the LONG treatments. Enzymes also increased rumen microbial yield,
428 estimated by the daily secretion of urinary allantoin, only when it was

429 supplemented to SHORT. Total tract starch digestibility tended ($P = 0.09$) to be
430 higher on LONG (94.0 vs. 93.1% of intake). Plasma glucose concentration was
431 similar among treatments, but FB tended ($P = 0.07$) to reduce PUN. Although
432 there was a trend for reduced PUN with FIB, a sampling time by FB interaction
433 was detected (Figure 1). Cows supplemented with FIB had lower PUN at 2 h
434 and 18 h post-feeding and higher PUN 12 h post-feeding than cows on NOFIB.

435 Fibrolytic enzyme supplementation reduced the loss of D kernels in feces
436 (130 vs. 202 kernels/d) and tended ($P = 0.08$) to reduce D kernels in feces as a
437 proportion of D kernels intake (Table 10). Fecal viscosity was reduced when
438 FIB was supplemented to SHORT whereas viscosity was increased when FIB
439 was supplemented to LONG ($P < 0.01$ for the interaction of PS and FB).
440 Fibrolytic enzymes reduced fecal DM concentration only when it was
441 supplemented to SHORT ($P = 0.02$ for the interaction of PS and FB) diet.

442 **DISCUSSION**

443 The traditional practice of Brazilian dairy farmers of harvesting forage
444 corn with PTFH regulated at low TLOC (3 mm-noKP) to achieve adequate grain
445 damage and facilitated packing during ensiling reduced the concentration of
446 peNDF in forage and did not induce as efficient kernel damage as KP. Forage
447 corn harvested at TLOC ranging from 3 to 8.5 mm had the proportion of
448 particles < 8 mm ranging from 16.6 to 38.2% of fresh forage, and the proportion
449 > 19 mm ranged from 2.4 to 12.0%. For the eight treatment means of

450 Experiment 1, there was good linear relationship between these two measures of
451 forage particle size: % of fresh forage < 8 mm = 40.593 – 1.952 x % of fresh
452 forage > 19 mm ($r^2 = 0.91$). Obtaining less than 16.6% of fresh forage < 8 mm
453 (14.6% of the NDF in forage) or more than 12% of fresh forage > 19 mm
454 (13.4% of the NDF in forage) was not feasible with PTFH. Forage corn
455 harvested in Experiment 1 at 8 mm-KP had 21.6% of fresh forage < 8 mm and
456 3.5% > 19 mm, and WPCS harvested in Experiment 2 at the same harvester set
457 up had 25.0% < 8 mm and 5.4% > 19 mm. Corn harvested at 3 mm-noKP had
458 34.8% of fresh forage < 8 mm in Experiment 1 and 44.7% in Experiment 2 and
459 fresh forage > 19 mm were 0.3% and 2.9%, respectively. The difference in
460 particle size for the same corn hybrid between experiments emphasize the role of
461 the harvester regulation as one, among other factors, determining forage particle
462 size. When compared to the particle distribution obtainable with self-propelled
463 forage harvesters (Vanderwerff et al., 2015), PTFH can induce large reduction in
464 WPCS peNDF concentration.

465 The practice of estimating peNDF_{>8} concentration in WPCS by
466 multiplying the NDF concentration in forage DM by the as fed or DM
467 distribution of particles on PSPS sieves (Yang and Beauchemin, 2006) was not
468 accurate. In Experiment 1, the peNDF_{>8-NDF} (based on the analyzed NDF
469 concentration of each feed fraction) ranged from 35.3 to 45.8% of WPCS DM
470 (41.0 ± 3.4 , mean \pm SD) and the calculated peNDF_{>8} ranged from 31.9 to 44.7%

471 of DM (37.5 ± 4.8). The estimated $\text{peNDF}_{>8}$ was consistently lower than the
472 analyzed $\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}}$ by an average of 3.5% NDF units in DM. The difference
473 between the two estimates within a treatment mean ranged from 2.4 to 22.2%
474 (9.9% on average). The linear relationship between the estimates was: $\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}} = 16.268 + 0.659 \text{peNDF}_{>8}$ ($r^2 = 0.90$), suggesting that the error in the
475 $\text{peNDF}_{>8}$ estimate is magnified as the proportion of large particles is reduced in
476 WPCS. Although there was good correlation between the estimates, practical
477 methodologies for increasing the accuracy of predicting the proportion of long
478 NDF in forages and diets can improve the precision feeding of dairy cows.
479 Calculations of long NDF concentration in WPCS based on the assumption of
480 uniformity in the NDF concentration of feed fractions differing in particle size
481 lacked accuracy.

483 The nutrient composition of silages SHORT and LONG was similar.
484 Harvesting the forage at longer TLOC increased the rate of harvesting, and
485 although it reduced silage density at storage, the fermentation profile was not
486 affected and it was adequate (Kung and Shaver, 2000). All measurements of
487 forage PS were sensitive to the change in WPCS processing at harvest, except
488 the proportion of particles below de 1.18 mm sieve, which showed to be less
489 responsive than the GMPS and the particle distribution measured with the 19
490 and 8 mm sieves. The use of KP increased kernel damage of LONG, even at a
491 larger TLOC than SHORT underscoring the importance of KP to increase kernel

492 damage in WPCS. Corn was harvested at the half milk line stage of maturity in
493 both experiments, the efficacy of the kernel processor of inducing kernel damage
494 at more advanced plant maturity stages and for corn with harder texture
495 endosperm requires further evaluation.

496 Diets SHORT and LONG had $\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}}$ of 14.3% and 18.7% of DM,
497 close to the values of 14.9 and 18.5% of DM, proposed by Zebeli et al. (2012) as
498 the desirable maximum to avoid DMI depression by long fiber and the minimum
499 to maintain ruminal pH, respectively. The higher concentration of peNDF in diet
500 LONG increased chewing activity, milk fat secretion, and ruminal pH, reduced
501 the proportion of butyrate in rumen VFA, and had no major impact on feed
502 sorting behavior. Total tract NDF digestibility was reduced on treatment
503 SHORT-NOFIB, suggesting that the reduction in PS was capable of depressing
504 the fibrolytic activity in the rumen.

505 The increase in diet $\text{peNDF}_{>8\text{-NDF}}$ concentration did not reduce DMI, as
506 would be expected based on Zebeli et al. (2012) compilation of the literature.
507 Diets in this experiment were formulated with high proportion of WPCS and
508 small proportion of low quality Tifton hay as forage sources, to be representative
509 of intensive confinement farming in Southeast Brazil. Starch content was around
510 32% of diet DM and around 40% of the starch from concentrate feedstuffs came
511 from a rapidly fermentable source (rehydrated and ensiled finely ground mature
512 corn). The type and concentration of NDF and NFC in the diet certainly

513 determine the response of dairy cows to peNDF (Armentano and Pereira, 1997).
514 Reducing forage particle size improved DMI when forage represented more than
515 50% of diet DM (Nasrollhi et al., 2015), however for the diets fed in this
516 experiment there was no evidence for a detrimental effect of increasing WPCS
517 particle size on DMI and lactation performance.

518 The trend for increased (+ 0.8% units) total tract starch digestibility in
519 diet LONG compared with SHORT had low biological meaning. The use of KP
520 increased CSPS and reduced visible grain concentration in silage LONG, even
521 with longer TLOC. Although the evaluation of WPCS kernel damage by the
522 CSPS technique (Ferreira and Mertens, 2005) has been under discussion (Dias
523 Junior et al., 2016), CSPS of silages were in agreement with the *in vivo* starch
524 digestibility of their respective diets. Furthermore, the degree of kernel damage
525 had major impact on fresh kernel ruminal degradation in Experiment 1. More
526 efficient rumen mat formation, induced by longer NDF in the diet, may have
527 also increased the retention time of corn kernels in the rumen, plausibly another
528 improver of kernel ruminal digestibility in diet LONG.

529 Mechanisms for the positive response in lactation performance to diet
530 LONG, at similar DMI, may have involved increased ruminal starch
531 degradation. However, rumen microbial yield did not respond to the increase in
532 diet particle size, based on the similarity in urinary allantoin secretion, MUN,
533 and PUN, even at lower concentration of protozoa in rumen fluid. The increase

534 in diet peNDF concentration increased the proportion of acetate and reduced
535 butyrate in rumen fluid. However, there was no detectable change in the ratio of
536 acetate to propionate, suggesting that no major change in the energetic efficiency
537 of the ruminal fermentation was induced by this level of nutritional
538 manipulation. Plasma glucose concentration was similar among treatments.

539 Fibrolytic enzyme supplementation to diet SHORT increased the total
540 tract NDF digestibility coefficient of that diet to the higher digestibility
541 coefficient values of diet LONG. The positive response to fibrolytic enzymes
542 only on diet SHORT suggests that the low concentration of peNDF in the diet
543 limited the ruminal fibrolytic activity. Exogenous fibrolytic enzymes also have a
544 lower optimum pH (around 5.0) than ruminal enzymes (Vicini et al., 2003).
545 Enzymes also reduced visible damaged kernels in feces, probably by action on
546 kernel pericarp fiber. Urinary allantoin secretion was the highest on diet
547 SHORT-FIB, suggesting an improvement in ruminal microbial synthesis in
548 response to increased fiber digestibility. However diet SHORT-FIB reduced
549 fecal DM concentration and fecal viscosity, and numerically reduced ruminal pH
550 and milk yield (Weak trends at $P < 0.14$ for the interaction of PS and FB). This
551 data suggests that the addition of fibrolytic enzymes to diets deficient in peNDF
552 can improve fiber digestibility. Morgavi et al. (2000) also observed that enzyme
553 supplementation alleviated the drop in NDF digestibility caused by low pH, but
554 did not affect NDF digestibility when pH was close to the optimum for fiber

555 digestion. Increasing with digestibility with propensity for ruminal acidosis
556 would not be desirable for dairy cows, but can be a plausible alternative to
557 improve diet digestibility of beef producing ruminants fed on low forage-high
558 non-forage fiber source diets.

559 Enzyme supplementation to diet SHORT also induced selective sorting
560 in favor of small feed particles, but it induced refusal of the same particles at
561 night when added to diet LONG. This observation demonstrates that the
562 manipulation of the ruminal fermentation by enzymes can effect ruminant
563 feeding behavior, and not only diet digestibility. The most acidogenic diet to the
564 rumen (SHORT-FIB) was also the diet that induced greatest selection for short
565 feed particles. What is cause and what is effect, is not clear and further
566 evaluation is required.

567

CONCLUSIONS

568 The use of PTFH set at 8.5 mm TLOC with a kernel processor increased
569 kernel damage and NDF particle size of WPCS compared to fine grinding
570 without kernel processor. The increase in peNDF_{>8}-NDF concentration from
571 14.3% to 18.7% of diet DM by manipulation of WPCS processing increased
572 lactation performance and had no effect on DMI. Fibrolytic enzyme
573 supplementation increased NDF digestibility only when supplementation was
574 done to the low peNDF diet, but it increased the propensity for ruminal acidosis.

575

576

ACKNOWLEDGMENTS

577

578

579

580

581

582

LITERATURE CITED

583

584

585

Adesogan, A. T. 2005. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. Pages 91–109 in Florida Ruminant Nutrition Symposium Proc., University of Florida-IFAS, Gainesville, FL.

586

587

588

Adesogan, A. T., Z. X. Ma, J. J. Romero, and K. G. Arriola. 2014. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.* 92:1317–1330.

589

590

Armentano, L., and M. Pereira. 1997. Measuring the effectiveness of fiber by animal response trials. *J. Dairy Sci.* 80:1416–1425.

591

592

593

ASAE (American National Standards Institute). 1995. Method of determining and expressing fineness of feed material by sieving. ASAE Standards 1995. ASAE, St. Joseph, MI, p. 461.

- 594 AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem.
595 Arlington, VA.
- 596 Bal, M. A., R. D. Shaver, A. G. Jirovec, K. J. Shinnars, and J. G. Coors. 2000.
597 Crop processing and chop length of corn silage: Effects on intake,
598 digestion, and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:1264-1273.
- 599 Bauman, D. E., and J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional
600 manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-
601 29.
- 602 Beauchemin, K. A., D. Colombatto, D. P., Morgavi, W. Z., Yang. 2003. Use of
603 exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J.*
604 *Anim. Sci.* 81: 37-47.
- 605 Beachemin, K.A., W.Z, Yang. 2005. Effects of physically effective fiber on
606 intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets
607 based on corn silage. *J. Dairy Sci.* 88:2117-2129.
- 608 Bernardes, T.F., and A. C., DO RÊGO. 2015. Study on the practices of silage
609 production and utilization on Brazilian dairy farms. ***J. Dairy Sci.*** V.97,
610 p.1852–1861.

- 611 Brossard, L., C. Martin, F. Chaucheyras-Durand, T. L. B. Michalet-Doreau.
612 2004. Protozoa involved in butyric rather than lactic fermentative pattern
613 during latent acidosis in sheep *Reprod. Nutr. Dev.*, 44:195-206.
- 614 Cannon, S. J., G.C. Fahey Jr., M. R. Murphy, C. L. Dikeman, B. L. Miller, J. K.
615 Drackley. 2010. Inclusion of psyllium in milk replacer for neonatal calves.
616 1. Effects on growth, digesta viscosity, rate of passage, nutrient
617 digestibilities, and metabolites in blood. *J. Dairy Sci.* 93:3652-3660.
- 618 Chen, X. B., and M. J. Gomes. 1992. Estimation of microbial protein supply to
619 sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: An
620 overview of technical details. *Int. Feed Res. Unit, Occasional Publ.* Rowett
621 Research Institute, Aberdeen, United Kingdom.
- 622 Colombatto, D., D. P. Morgavi, A. F. Furtado, and K. A. Beauchemin. 2003.
623 Screening of exogenous enzymes for ruminants diets: Relationship between
624 biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. *J. Anim. Sci.*
625 81: 2628-2638.
- 626 Correa, C. E. S., R. D. Shaver, M. N. Pereira, J. G. Lauer, and K. Kohn. 2002.
627 Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch
628 degradability. *J. Dairy Sci.* 85:3008-3012.

- 629 Dehority, B. A. 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used
630 for counting rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:182-185.
- 631 DeVries, T. J., F. Dohme, and K. A. Beauchemin. 2008. Repeated ruminal
632 acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for
633 developing acidosis: Feed sorting. *J. Dairy Sci.*, 91: 3958–3967.
- 634 Dias Junior, G. S., Ferraretto L. F., Salvati, G. G., Resende, L. C., Hoffman,
635 P.C., Pereira, M. N., and R. D. Shaver. Relationship between processing
636 score and kernel-fraction particle size in whole-plant corn silage. *J. Dairy*
637 *Sci.* 99:2719-2729.
- 638 Diez-Gonzalez, F., D. R. Bond, E. Jennings, and J. B. Russell. 1999. Alternative
639 schemes of butyrate production in *Butyrivibrio fibrisolvens* and their
640 relationship to acetate utilization lactate production, and phylogeny.
641 *Archives of Microbiology.* 171:324-330.
- 642 Eun, J. S., and K. A. Beauchemin. 2007. Enhancing in vitro degradation of
643 alfalfa hay and corn silage using feed enzymes. *J. Dairy Sci.* 90:2839-2851.
- 644 Ferraretto, L. F., and R. D. Shaver. 2012. Effect of corn shreddlage on lactation
645 performance and total tract starch digestibility by dairy cows. *Prof. Anim.*
646 *Sci.* 28:639–647.

- 647 Ferreira, G., and D. R. Mertens. 2005. Chemical and physical characteristics of
648 corn silages and their effects of in vitro disappearance. *J. Dairy Sci*
649 88:4414-4425.
- 650 Freitas, A. N., Inventor. 2010. Equipamento para corte de forragem com
651 quebrador de grãos de milho e sorgo para a produção de ração animal. BR
652 Pat. MU9000462.
- 653 Hall, M. B. 2009. Analysis of starch, including maltooligosaccharides in animal
654 feeds: a comparison of methods and a recommended method for AOAC
655 collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 92:42-49.
- 656 Hristov, A. N., Rode, K.A. Beauchemin, and R.L. Wuerfel. 1996. Effect of a
657 commercial enzyme preparation on barley silage in vitro and in sacco dry
658 matter degradability. *Proc. West. Sect. Am. Soc. Anim.*, 47:282-284.
- 659 Johnson, L. M., J. H. Harrison, D. Davidson, C. Hunt, W. C. Mahanna, and K.
660 Shinnars. 2003. Corn silage management: Effects of hybrid, maturity, chop
661 length, and mechanical processing on rate and extent of digestion. *J. Dairy*
662 *Sci.* 86:3271-3299.

- 663 Kmicikewycz, A. D. and, A. J. Heinrichs. 2015. Effect of corn silage particle
664 size and supplemental hay on rumen pH and feed preference by dairy cows
665 fed high-starch diets. *J. Dairy Sci.* 98: 373-385.
- 666 Kononoff, P. J., and A. J. Heinrichs. 2002. Evaluating particle size of forages
667 and TMRs using the New Penn State Forage Particle Separator. DAS-02-
668 042. College of Agricultural Sciences, Cooperative Extension. Penn State
669 Univ., University Park, PA.
- 670 Kononoff, P. J., A. J. Heinrichs, and D. A. Buckmaster. 2003. Modification of
671 the Penn State forage and total mixed ration particle separator and the
672 effects of moisture content on its measurements. *J. Dairy Sci.* 86:1858–
673 1863.
- 674 Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2005. Inducing subacute ruminal acidosis in
675 lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88:3633–3639.
- 676 Kung, L., and R. Shaver. 2000. Interpretation and use of silage fermentation
677 analysis report. Accessed Nov. 24, 2014.
678 <http://fyi.uwex.edu/forage/files/2014/01/Fermentation.pdf>.

- 679 Lammers, B. P., D. R. Buckmaster, and A. J. Heinrichs. 1996. A simple method
680 for the analysis of particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy*
681 *Sci.* 79:922–928.
- 682 Leonardi, C., and L. E. Armentano. 2003. Effect of quantity, quality, and length
683 of alfalfa hay on selective consumption by dairy cows. *J. Dairy Sci.*
684 86:557–564.
- 685 Muck, R. E., and J. T. Dickerson. 1988. Storage temperature effects on
686 proteolysis in alfalfa silage. *Trans. ASAE.* 1988; 31:1005-1009.
- 687 NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle.* 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci.,
688 Washington, DC.
- 689 Phakachoed, N, W. Suksombat, D. Colombatto, and K. A. Beauchemin. 2013.
690 Use of fibrolytic enzymes additives to enhance in vitro ruminal
691 fermentation of corn silage. *Livest Sci.* 157: 100-112.
- 692 SAS Institute. 2004. *SAS/STAT 9.1 User's Guide.* Version 9.1 ed, Cary, NC.
- 693 Sutton, J. D., R. H. Phipps, D. E. Beever, D. J. Humphries, D. J., Hartnell, G.
694 F., Vicini, J. L., Hard, D. L. 2003. Effect of method of application of a
695 fibrolytic enzyme product on digestive processes and milk production in
696 Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86: 546-556.

- 697 Vicini, J. L., H. G. Bateman, M. K. Bhat, J. H. Clark, R. A. Erdman, R. H.
698 Phipps, M. E. van Amburgh, G. F. Hartnell, R. L. Hintz, and D. L. Hard.
699 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars
700 with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* 86:576-585.
- 701 Wildman, E. E., G. M. Jones, P. E. Wagner, R. L. Boman, H. F. Troutt, and T.
702 N. Lesch. 1982. A dairy-cow body condition scoring system and its
703 relationship to selected production characteristics. *J. Dairy Sci.* 65:495-501.
- 704 Yang, W. Z., and K. A. Beauchemin. 2007. Altering physically effective fiber
705 intake through forage proportion and particle length: Chewing and ruminal
706 pH. *J. Dairy Sci.* 90:2826-2838.
- 707 Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 1999. Effects of an enzyme
708 feed additive on extent of digestion and milk production of lactating dairy
709 cows. *J. Dairy Sci.* 82:391-403.
- 710 Zebeli, Q., M. Tafaj, B. Junck, V. Ölschläger, B. N. Ametaj, and W. Drochner.
711 2008a. Evaluation of the response of ruminal fermentation and activities of
712 non-starch polysaccharide-degrading enzymes to particle length of corn
713 silage in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:2388-2398.

- 714 Zebeli, Q., J. Dijkstra, M. Tafaj, H. Steingass, B. N. Ametaj, and W. Drochner.
715 2008b. Modeling dietary fiber adequacy in dairy cows based on responses
716 of ruminal pH and milk fat production to diet composition. *J. Dairy Sci.*,
717 91:2046–2066.
- 718 Zebeli, Q., J. R. Aschenbach, M. Tafaj, J. Boguhn, B. N. Ametaj, and W.
719 Drochner. 2012. Invited review: Role of physically effective fiber and
720 estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *J. Dairy*
721 *Sci.* 95:1041–1056.

722 Table 1. Ruminal DM degradation (DEG) of visible corn kernels differing in degree of
 723 damage after 12, 30, and 72 h of *in situ* incubation.

	Extremely Damaged	Damaged	Intact	SEM	<i>P</i> -value
DEG 12, % of DM	24.4 ^a	12.6 ^b	11.5 ^b	0.73	<0.01
DEG 30, % of DM	39.5 ^a	26.2 ^b	23.6 ^b	0.83	<0.01
Residue 72, % of DM	25.2 ^a	39.4 ^b	48.3 ^c	0.83	<0.01

724 ^{a-c} means without common superscripts in row differ at $P < 0.05$ (Bonferroni)

725
726
727

Table 2. Visible kernels (I = Intact. D = Damaged. ED = Extremely Damaged) and cobs (W = Whole. B = Broken) and particle size (using Penn State Particle Separator) of corn harvested at 3, 4.5, 6, and 8.5 mm theoretical length of cut (TLOC), with or without (noKP) kernel processor (KP)

	noKP				KP				SEM	P-value			C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹
	3	4.5	6	8.5	3	4.5	6	8.5		KP	TLOC	KP*TLOC			
Visible kernels and cobs, N/500 g of fresh forage															
I	30	34	58	73	12	22	32	34	2.8	<0.01	<0.01	<0.01	0.02	<0.01	<0.01
D	59	71	68	66	41	42	46	38	3.5	<0.01	0.23	0.18	0.07	0.75	0.88
ED	112	118	137	128	79	77	108	93	7.1	<0.01	<0.01	0.21	0.31	<0.01	0.06
W	1	1	1	1	0	0	1	1	0.4	0.06	0.39	0.54	0.81	0.65	0.93
B	5	11	12	12	3	7	11	11	1.1	0.03	<0.01	0.32	<0.01	0.04	0.56
I+D	90	105	127	140	53	64	78	72	5.5	<0.01	<0.01	0.02	0.02	<0.01	0.47
I+D+ED	202	223	263	267	132	142	186	165	10.0	<0.01	<0.01	0.22	0.37	<0.01	0.31
Particles on sieve, % of fresh forage															
> 19 mm	3.2	4.5	7.9	12.0	2.4	3.3	5.9	11.5	0.32	<0.01	<0.01	0.46	<0.01	<0.01	<0.01
8 - 19 mm	61.9	66.4	70.1	71.4	59.4	61.1	66.3	66.9	0.59	<0.01	<0.01	0.73	<0.01	<0.01	0.07
< 8 mm	34.8	29.1	22.0	16.6	38.2	35.7	27.8	21.6	0.66	<0.01	<0.01	0.54	<0.01	<0.01	<0.01
Starch, % of starch in forage															
> 19 mm	0.3	0.8	2.5	3.1	0.2	0.5	1.0	3.5	0.33	<0.01	<0.01	0.05	0.63	<0.01	<0.01
8 - 19 mm	79.0	77.2	73.9	76.1	64.8	63.8	67.0	68.0	1.45	<0.01	0.53	0.02	0.44	0.73	0.18
< 8 mm	20.7	22.0	23.6	20.8	35.0	35.7	32.0	28.5	1.49	<0.01	0.02	0.08	0.25	0.19	0.03
Starch, % of DM in sieve fraction															
> 19 mm	2.7	4.6	10.1	8.2	1.8	4.5	5.4	9.7	1.06	0.27	<0.01	0.05	0.03	<0.01	0.43
8 - 19 mm	35.4	32.8	31.8	31.3	30.8	30.1	30.8	31.7	1.24	<0.01	0.68	0.74	0.48	0.73	0.39
< 8 mm	19.4	24.5	38.1	36.4	28.3	31.1	37.5	39.4	1.43	<0.01	<0.01	0.22	0.05	<0.01	0.23
NDF, % of NDF in forage															
> 19 mm	4.4	6.2	10.1	13.4	3.3	4.5	7.6	13.1	0.53	<0.01	<0.01	0.04	<0.01	<0.01	<0.01
8 - 19 mm	67.4	71.1	71.7	72.0	72.2	70.3	71.3	69.1	0.84	0.49	0.46	<0.01	0.67	0.54	0.62
< 8 mm	28.2	22.7	18.1	14.6	24.5	25.2	21.1	17.8	0.89	0.07	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
NDF, % of DM in sieve fraction															
> 19 mm	69.0	68.4	68.4	65.2	69.1	68.6	68.3	65.6	0.67	0.35	<0.01	0.39	0.76	0.85	<0.01
8 - 19 mm	50.1	53.7	52.2	53.6	60.8	58.4	54.9	56.2	0.92	<0.01	0.59	<0.01	0.52	<0.01	0.87

	noKP				KP				SEM	P-value			C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹
	3	4.5	6	8.5	3	4.5	6	8.5		KP	TLOC	KP*TLOC			
< 8 mm	45.2	44.9	46.3	46.3	35.0	38.7	41.6	42.7	0.91	<0.01	<0.01	<0.01	0.41	0.04	0.41
% of forage DM															
Starch	29.7	29.3	30.9	29.6	29.1	29.6	31.0	31.1	0.67	0.18	0.06	0.50	0.16	0.09	0.34
NDF	49.2	52.1	52.2	53.6	51.7	52.1	52.2	54.2	0.50	0.08	0.07	0.09	0.04	0.12	0.02

728 ¹Contrasts: C1 = 3 mm vs. 4.5 mm. C2 = 4.5 mm vs. 6 mm. C3 = 6 mm vs. 8.5 mm.

729 Table 3. Fermentation profile, composition, particle size, rate of harvesting and density
 730 of whole plant corn silage differing in theoretical length of cut (SHORT, LONG) and the
 731 Standard silage. (16 samples/silage. Mean \pm SD)

	SHORT	LONG	Standard
pH	3.92 \pm 0.09	3.99 \pm 0.08	3.86 \pm 0.11
Fermentation profile, % of DM			
Lactate	6.33 \pm 0.26	5.81 \pm 0.32	4.11 \pm 1.1
Acetate	1.11 \pm 0.11	1.43 \pm 0.15	1.08 \pm 0.23
Propionate	0.14 \pm 0.09	0.08 \pm 0.09	0.06 \pm 0.10
Ethanol	3.44 \pm 0.11	3.08 \pm 0.24	1.63 \pm 0.36
Composition, % of DM			
CP	7.3 \pm 0.4	7.2 \pm 0.4	6.3 \pm 0.6
NDF	52.2 \pm 1.1	51.9 \pm 0.9	53.8 \pm 1.2
ADF	28.8 \pm 1.4	29.0 \pm 1.6	35.2 \pm 2.1
Ether extract (EE)	2.4 \pm 0.8	2.6 \pm 0.6	2.9 \pm 0.5
Ash	4.4 \pm 0.6	4.7 \pm 0.7	4.3 \pm 0.9
NFC ¹	33.7 \pm 2.7	33.6.1 \pm 2.4	32.7 \pm 2.2
Starch	30.6 \pm 0.6	30.2 \pm 0.5	27.4 \pm 0.7
Particle size ²			
> 19 m., % of as fed	2.9 \pm 1.2	5.4 \pm 2.1	4.6 \pm 1.8
8 - 19 mm, % of as fed	52.3 \pm 3.9	69.3 \pm 3.2	63.5 \pm 4.1
1.18 - 8 mm, % of as fed	43.1 \pm 2.1	23.6 \pm 2.3	30.5 \pm 1.9
< 1.18, % of as fed	1.6 \pm 0.4	1.4 \pm 0.6	1.4 \pm 0.7
> 19 mm, % of DM	2.8 \pm 0.8	5.5 \pm 1.1	2.8 \pm 1.4
8 - 19 mm, % of DM	51.7 \pm 2.3	72.6 \pm 2.8	56.5 \pm 1.9
1.18 - 8 mm, % of DM	42.7 \pm 1.4	19.1 \pm 0.9	38.7 \pm 0.5
< 1.18, % of DM	2.8 \pm 0.5	2.1 \pm 0.7	2.0 \pm 0.3
GMPS, ³ mm	7.16 \pm 0.42	9.28 \pm 0.49	7.47 \pm 0.67
NDF > 19 mm, % of DM	2.0 \pm 0.9	3.6 \pm 1.2	1.6 \pm 0.9
NDF 8 - 19 mm, % of DM	35.8 \pm 0.8	41.5 \pm 1.1	38.4 \pm 0.7
NDF 1.18 - 8 mm, % of DM	12.3 \pm 1.2	5.0 \pm 0.8	10.3 \pm 1.3
NDF < 1.18 mm, % of DM	1.3 \pm 0.23	1.1 \pm 0.17	2.8 \pm 1.4
CSPS, ⁴ %	55.1 \pm 2.1	59.2 \pm 2.0	60.6 \pm 2.5
Rate of harvesting, ⁵ kg/h	18,276 \pm 684	20,334 \pm 734	---
Density, ⁶ kg/m ³	618.2 \pm 42.7	604.5 \pm 45.3	---
DM, % of as fed	33.4 \pm 0.9	33.1 \pm 1.3	34.1 \pm 0.8
Intact kernels, N/500 g of fresh silage	4 \pm 0.4	3 \pm 0.3	3 \pm 0.5
Damaged kernels, N/500 g of fresh silage	13 \pm 0.6	12 \pm 0.4	11 \pm 0.7

732 ¹Non-fiber carbohydrates = 100 - (CP + NDF + EE + ash)

733 ²Particle size distribution measured with the Penn State Particle Separator

734 ³Geometric mean particle size was calculated on an as-fed basis (Kononoff and Heinrichs, 2002).

735 Identical values for GMPS on DM and as fed basis.

736 ⁴Corn Silage Processing Score = % of starch passing through a 4.75 mm diameter sieve (Ferreira
 737 and Mertens, 2005)

738 ⁵Mean of 6 wagonloads at harvesting

739 ⁶Mean of 12 measurements along the experiment (4/Period).

740 Table 4. Ingredient composition of the offered TMR, nutrient composition of the
 741 consumed diets, and diet particle size on treatments differing in corn silage theoretical
 742 length of cut (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation
 743 (NOFIB) with fibrolytic enzymes.

	SHORT		LONG	
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB
Ingredients, % of DM				
Corn silage SHORT	31.58	31.60		
Corn silage LONG			31.67	31.66
Corn silage Standard	17.16	17.15	17.12	17.12
Tifton hay	1.95	1.95	1.94	1.94
Optigen	0.50		0.50	
Optimase		0.50		0.50
Finely ground corn	11.12	11.12	11.09	11.09
Finely ground rehydrated and ensiled corn	7.10	7.09	7.12	7.12
Soybean meal	18.8	18.78	18.75	18.76
Citrus pulp	9.27	9.28	9.30	9.30
Magnesium oxide	0.30	0.30	0.30	0.30
Sodium bicarbonate	1.06	1.06	1.06	1.06
Salt	0.13	0.13	0.13	0.13
Limestone	0.68	0.68	0.68	0.68
Minerals and vitamins ¹	0.38	0.38	0.38	0.38
Nutrients, % of DM				
CP	16.75	16.51	16.57	16.74
NDF	31.93	32.11	32.60	32.45
peNDF _{>8-NDF} ²	14.19	14.41	18.83	18.50
peNDF _{>1.18-NDF} ²	30.11	30.24	30.95	30.71
Ether extract (EE)	4.22	4.30	3.93	3.97
Ash	6.12	6.36	6.21	6.25
NFC ³	40.86	40.98	40.80	40.76
Starch	31.73	31.64	31.69	31.71
Particle size of the offered TMR				
> 19 mm, % of as fed	4.42	4.05	6.69	6.81
8 - 19 mm, % of as fed	39.32	40.49	47.44	47.82
1.18 - 8 mm, % of as fed	51.15	50.05	40.90	40.3
< 1.18 mm, % of as fed	5.11	5.41	4.97	5.07
GMPS, ⁴ mm on as fed basis	6.01	6.06	6.98	6.97
> 19 mm, % of DM	3.58	3.26	5.53	5.61
8 - 19 mm, % of DM	33.60	34.24	45.11	45.33
1.18 - 8 mm, % of DM	54.38	53.68	41.43	40.70
< 1.18 mm, % of DM	8.41	8.81	7.91	8.35
GMPS, ⁴ mm on DM basis	5.24	5.21	6.33	6.32
NDF > 19 mm, % of DM	1.86	1.85	3.29	2.66
NDF 8 - 19 mm, % of DM	12.31	12.56	15.54	15.84
NDF 1.18 - 8 mm, % of DM	15.94	15.83	12.12	12.21

NDF < 1.18 mm, % of DM	1.91	1.80	1.54	1.71
DM, % of as fed	48.13	48.07	48.36	48.56

744 ¹18.5 % Ca, 15.0 % P, 3.0 % Mg, 3.0 % S, 240 mg Co/kg, 3,000 mg Cu/kg, 8,000 mg Mn/kg,
 745 12,000 mg Zn/kg, 90 mg Se/kg, 180 mg I/kg, 1,000 KIU Vitamin A/kg, 250,000 KIU Vitamin
 746 D/kg, 50,000 UI Vitamin E/kg

747 ²peNDF = analyzed NDF in DM retained above the 8 and 1.18 mm sieves of the Penn State
 748 Particle Separator

749 ³Non-fiber carbohydrates = 100 - (NDF + CP + EE + Ash)

750 ⁴Geometric mean particle size (Kononoff and Heinrichs, 2002).

751

752 Table 5. Intake, lactation performance, milk urea-N (MUN), and feed efficiency on
 753 treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and
 754 supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes.

	SHORT		LONG		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB		PS	FB	PSxFB
DMI, kg/d	22.1	21.4	22.4	21.9	0.58	0.50	0.28	0.85
DOMI, ² kg/d	14.8	14.6	15.5	15.0	0.62	0.22	0.47	0.63
Milk, kg/d	32.3	31.5	32.4	32.9	1.63	0.08	0.70	0.11
4%FCM, ³ kg/d	28.9	27.5	29.5	29.4	1.15	0.05	0.25	0.18
ECM, ⁴ kg/d	30.3	29.1	31.0	30.9	1.15	0.05	0.32	0.25
Fat, %	3.40	3.19	3.51	3.42	0.127	0.10	0.12	0.55
Protein, %	3.11	3.12	3.19	3.16	0.077	0.33	0.83	0.79
Lactose, %	4.63	4.65	4.63	4.58	0.079	0.50	0.86	0.49
Solids, %	12.16	12.04	12.24	11.99	0.203	0.92	0.30	0.69
Fat, kg/d	1.073	0.994	1.117	1.098	0.0440	0.04	0.12	0.41
Protein, kg/d	0.990	0.974	1.014	1.022	0.0380	0.14	0.85	0.67
Lactose, kg/d	1.483	1.457	1.475	1.483	0.0771	0.70	0.70	0.52
Solids, kg/d	3.880	3.779	3.881	3.870	0.1532	0.43	0.37	0.50
MUN, mg/dL	16.5	17.3	17.6	16.8	0.52	0.59	0.94	0.11
Milk/DMI	1.47	1.47	1.47	1.51	0.089	0.56	0.57	0.59
ECM/DMI	1.38	1.36	1.41	1.41	0.066	0.32	0.87	0.70
ECM/DOMI	2.09	1.99	2.03	2.07	0.091	0.95	0.62	0.28

755 ¹PS = Particle size. FB = Fibrolytic enzymes. PSxFB = Interaction of PS and FB.

756 ²Digestible organic matter intake.

757 ³4% fat corrected milk.

758 ⁴Energy corrected milk.

759

760 Table 6. Chewing pattern on treatments differing in corn silage theoretical length of cut
 761 (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with
 762 fibrolytic enzymes.

	SHORT		LONG		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB		PS	FB	PSxFB
Ingestion, min/d	322	308	341	341	9.0	0.08	0.45	0.46
Rumination, min/d	436	420	448	472	17.9	0.07	0.82	0.27
Chewing, ² min/d	758	729	791	815	20.2	0.01	0.89	0.20
Ingestion, min/kg DMI	14.8	14.5	15.6	15.7	0.59	0.12	0.91	0.73
Rumination, min/kg DMI	19.9	19.3	20.2	21.7	0.83	0.10	0.56	0.23
Chewing, min/kg DMI	34.7	33.9	35.8	37.5	1.03	0.03	0.68	0.24
First meal duration, min	49.1	47.6	45.9	43.4	2.25	0.08	0.38	0.82
Chews/Ruminated bolus	66.9	63.1	68.9	69.4	3.13	0.10	0.51	0.44

763 ¹PS = Particle size. FB = Fibrolytic enzymes. PSxFB = Interaction of PS and FB

764 ²Chewing = Ingestion + Rumination

765

766 Table 7. Feed sorting behavior in periods of the day on treatments differing in
 767 corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and supplementation
 768 (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes. (> 100 =
 769 preferential intake, < 100 = refusal, 100 = no selection)

	SHORT		LONG		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB		PS	FB	PSxFB
7 am – 1 pm								
Particles > 19 mm ²	68	65	70	68	5.9	0.66	0.64	0.97
Particles 8 – 19 mm	98	100	100	100	1.4	0.55	0.35	0.44
Particles < 8 mm	103	101	104	104	1.6	0.35	0.51	0.68
Refusal, % of offered	35.2	34.3	37.1	39.7	8.63	0.46	0.55	0.69
1 pm – 7 pm								
Particles > 19 mm	74	64	68	63	6.2	0.08	0.26	0.63
Particles 8 – 19 mm	98 ^{ab}	93 ^b	100 ^a	102 ^a	1.8	0.01	0.59	0.04
Particles < 8 mm	103 ^a	108 ^b	105 ^a	104 ^a	1.4	0.69	0.20	0.05
Refusal, % of offered	37.3	38.6	39.1	38.5	9.37	0.41	0.38	0.54
7 pm – 7 am								
Particles > 19 mm	90	85	83	103	8.8	0.54	0.43	0.16
Particles 8 – 19 mm	100 ^b	98 ^{bc}	96 ^c	105 ^a	2.5	0.65	0.17	0.03
Particles < 8 mm	91 ^c	104 ^b	110 ^a	93 ^{bc}	5.7	0.52	0.81	0.01
Refusal, % of offered	25.4	30.6	34.9	28.2	5.86	0.34	0.79	0.35

770 ¹PS = Particle size. FB = Fibrolytic enzymes. PSxFB = Interaction of PS and FB.

771 ²Particle size measured with the Penn State Particle Separator.

772 ^{a-c} means without common superscripts in row differ at *P* < 0.05 (Bonferroni).

773

774 Table 8. Ruminal fluid VFA, pH, and protozoa concentration on treatments
 775 differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG) and
 776 supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic enzymes.

	SHORT		LONG		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB		PS	FB	PSxFB
VFA, % of total								
Acetate	58.3	57.8	60.9	58.7	1.37	0.09	0.33	0.54
Propionate	26.6	25.6	25.7	26.1	1.07	0.85	0.82	0.51
Butyrate	15.0	16.5	13.3	15.3	0.74	0.05	0.04	0.85
Acetate/Propionate	2.39	2.36	2.43	2.37	0.15	0.86	0.79	0.92
pH	6.56	6.38	6.69	6.72	0.077	0.01	0.31	0.14
Protozoa, x 10 ⁴ /mL	24.1	22.8	18.5	19.4	2.15	0.05	0.88	0.55

777 ¹PS = Particle size. FB = Fibrolytic enzymes. PSxFB = Interaction of PS and FB.

778 Table 9. Total tract apparent digestibility (% of intake), allantoin in urine,
 779 plasma glucose 12 h post-feeding, and plasma urea nitrogen (PUN) over time on
 780 treatments differing in corn silage theoretical length of cut (SHORT or LONG)
 781 and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB) with fibrolytic
 782 enzymes.

	SHORT		LONG		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB		PS	FB	PSxFB
DMD ²	67.0 ^b	71.2 ^a	71.0 ^a	71.1 ^a	1.42	0.20	0.15	0.10
OMD ²	70.7 ^b	73.6 ^a	73.6 ^a	73.0 ^a	1.33	0.27	0.28	0.05
NDFD ²	29.9 ^b	34.9 ^a	34.6 ^a	35.7 ^a	3.65	0.26	0.35	0.05
Non- NDFOMD ²	83.0	86.9	85.6	87.3	1.08	0.31	0.05	0.16
StarchD ²	92.7	93.7	93.8	94.2	0.89	0.09	0.15	0.47
Allantoin, mmoles/d	23.1 ^b	35.9 ^a	24.3 ^b	23.2 ^b	2.62	0.04	0.01	0.03
Glucose, mg/dL	62	59	64	61	2.8	0.42	0.27	0.90
PUN, ³ mg/dL	19.5	19.1	19.3	18.6	0.50	0.33	0.07	0.70

783 ¹PS = Particle size. FB = Fibrolytic enzymes. PSxFB = Interaction of PS and FB.

784 ²Digestibilities of DM, OM, NDF, Non-NDF OM, and starch.

785 ³*P* < 0.01 for the effect of time post-feeding, *P* = 0.05 for the interaction of FB and time,
 786 *P* = 0.41 for the interaction of PS and time, *P* = 0.38 for the interaction of FB, PS and
 787 time.

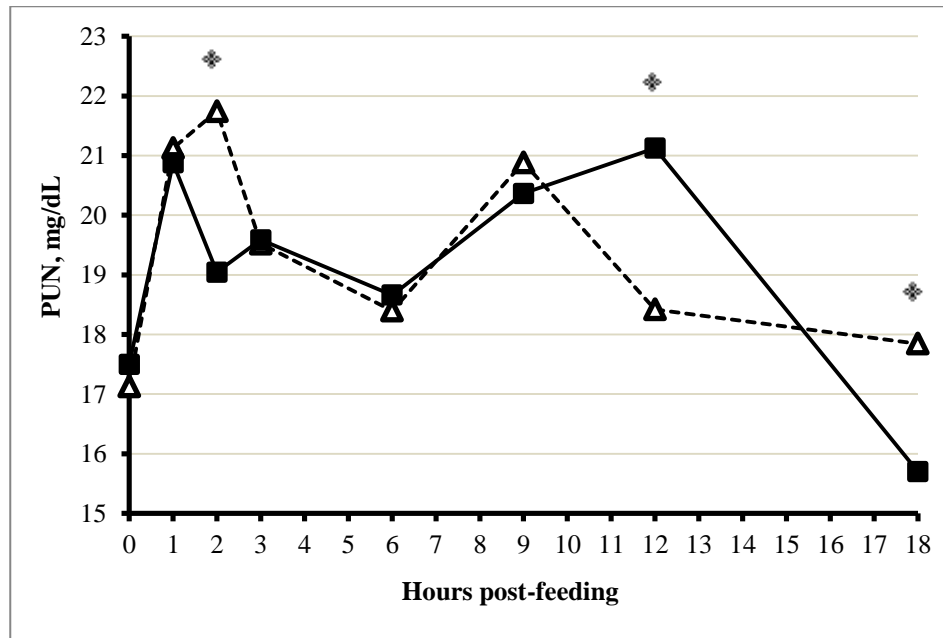
788 ^{a-b} means without common superscripts in row differ at *P* < 0.05 (Bonferroni)

789 Table 10. Visible corn kernels in feces (I = Intact, D = Damaged) and fecal DM,
 790 pH, and viscosity on treatments differing in corn silage theoretical length of cut
 791 (SHORT or LONG) and supplementation (FIB) or no supplementation (NOFIB)
 792 with fibrolytic enzymes.

	SHORT		LONG		SEM	<i>P</i> -value ¹		
	NOFIB	FIB	NOFIB	FIB		PS	FB	PSxFB
I intake, N/d	100	96	96	99	3.0	0.76	0.96	0.20
D intake, N/d	337	312	325	324	8.9	0.97	0.15	0.19
I in feces, N/d	60	58	60	64	13.4	0.83	0.97	0.86
D in feces, N/d	182	134	222	126	36.3	0.65	0.05	0.49
I in feces, % of intake	60.8	66.4	60.7	64.2	12.7	0.92	0.72	0.93
D in feces, % of intake	57.1	47.3	70.3	36.2	11.96	0.92	0.08	0.32
Fecal fresh, kg/d	58.7	56.1	55.7	54.4	1.68	0.15	0.14	0.51
Fecal DM, % of fresh	12.0 ^a	11.1 ^c	11.5 ^b	11.7 ^{ab}	0.23	0.88	0.14	0.02
Fecal pH	6.21	6.45	6.44	6.45	0.14	0.42	0.41	0.40
Fecal viscosity, cP	73.6 ^{bc}	53.1 ^c	77.6 ^b	80.5 ^a	3.68	0.01	0.01	<0.01

793 ¹PS = Particle size. FB = Fibrolytic enzymes. PSxFB = Interaction of PS and FB.

794 ^{a-c} means without common superscripts in row differ at $P < 0.05$ (Bonferroni)



795

796 Figure 1. Plasma urea nitrogen (PUN) over time of dairy cows supplemented (■) or not
 797 (△) with fibrolytic enzymes (FB). $P = 0.07$ for FB, $P = 0.32$ for particle size (PS), $P =$
 798 0.70 for PS x FB, $P < 0.01$ for hour, $P = 0.05$ for FB x hour, $P = 0.41$ for PS x hour, $P =$
 799 0.38 for FB x PS x hour. SEM= 0.975. Symbol (✱) $P < 0.01$ (slice option).

**ARTIGO 2 - RELATIONSHIP BETWEEN PROCESSING SCORE AND
KERNEL-FRACTION PARTICLE SIZE IN WHOLE-PLANT CORN
SILAGE**

Artigo formatado de acordo com a norma para submissão do Journal of Dairy Science.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

ABSTRACT

Kernel processing increases starch digestibility in whole-plant corn silage (WPCS). Corn silage processing score (CSPS), the percentage of starch passing through a 4.75 mm sieve, is widely used to assess degree of kernel breakage in WPCS. However, the geometric mean particle size (GMPS) of the kernel-fraction that passes through the 4.75 mm sieve has not been well described. Therefore, the objectives of this study were: 1) to evaluate particle size distribution and digestibility of kernels cut in varied particle sizes; 2) to propose a method to measure GMPS in WPCS kernels; and 3) to evaluate the relationship between CSPS and GMPS of the kernel-fraction in WPCS. Composite samples of unfermented, dried kernels from 110 corn hybrids commonly used for silage production were kept whole (WH) or manually cut in 2, 4, 8, 16, 32 or 64 pieces (2P, 4P, 8P, 16P, 32P, and 64P, respectively). Dry-sieving to determine GMPS, surface area and particle size distribution using 9 sieves with nominal square apertures of 9.50, 6.70, 4.75, 3.35, 2.36, 1.70, 1.18, 0.59 mm and pan, and ruminal in situ DM digestibilities were performed for each particle size. Incubation times were 0, 3, 6, 12, and 24h. The ruminal in situ DM disappearance of unfermented kernels increased with the reduction in particle size of corn kernels. Kernels kept whole had the lowest ruminal DM disappearance for all time-points with maximum DM disappearance of 6.9% at 24 h and the greatest disappearance was observed for 64P, followed by 32P and

22 16P. Samples of WPCS (n = 80) from 3 studies representing varied theoretical
23 length of cut settings and processor types and settings were also evaluated. Each
24 WPCS sample was divided in two and then dried at 60°C for 48 h. The CSPS
25 was determined in duplicate on 1 of the split samples, while on the other split
26 sample the kernel and stover fractions were separated using a hydrodynamic
27 separation procedure. After separation, the kernel-fraction was re-dried at 60°C
28 for 48 h in a forced-air oven and dry-sieved to determine GMPS and surface
29 area. Linear relationships between CSPS from WPCS (n = 80) and kernel-
30 fraction GMPS ($R^2 = 0.11$), surface area ($R^2 = 0.06$) and proportion passing
31 through the 4.75 mm screen ($R^2 = 0.34$) were poor. Strong quadratic
32 relationships between proportion of kernel-fraction passing through the 4.75 mm
33 screen and kernel-fraction GMPS and surface area were observed. These
34 findings suggest that hydrodynamic separation and dry-sieving of the kernel-
35 fraction may provide a better assessment of kernel breakage in WPCS than
36 CSPS.

37 INTRODUCTION

38 Whole-plant corn silage (**WPCS**) is a high-energy forage with high dry
39 matter (**DM**) yield per hectare from kernel and stover fractions which are high in
40 starch and NDF contents, respectively. The kernel-fraction, comprised of
41 approximately 72% starch (DM basis; Huntington, 1997), represents nearly 45%
42 of the whole-plant DM (Philippeau and Michalet-Doreau, 1998) and more than

43 50% of the energy in WPCS (calculated using NRC, 2001). Total tract starch
44 digestibility of WPCS, however, ranges from about 80-98% in lactating dairy
45 cows fed WPCS-based diets (Ferraretto and Shaver, 2012b). Processing WPCS
46 through rollers during harvest reduces the particle size of corn kernels, and has
47 been reported to increase total tract starch digestibility (Bal et al., 2000; Johnson
48 et al., 2002; Cook and Bernard, 2005). Nevertheless, the efficacy of kernel
49 processing in WPCS is variable and can be influenced by several factors,
50 including maturity or DM content of WPCS at harvest, theoretical length of cut
51 (TLOC), type of processor, and processor roll-gap clearance (Shinners et al.,
52 2000; Ferraretto and Shaver, 2012a, b). Therefore, methods to evaluate the
53 adequacy of kernel processing in WPCS are critical.

54 Ferreira and Mertens (2005) established a methodology to determine
55 degree of kernel breakage in WPCS defined as corn silage processing score
56 (CSPS). This methodology is widely used in the dairy industry and measures the
57 proportion of starch passing through a 4.75 mm sieve after vertical shaking
58 separation procedures using dried WPCS samples. However, the use of a single
59 sieve to determine degree of kernel processing leads to the assumption that all
60 particles passing through this sieve are equal. It is unknown, however, if the
61 proportion of different fragments comprising this pool of particles vary widely.
62 Wide variation would suggest that differences in starch digestibility among
63 WPCS samples of similar CSPS exists.

64 Mean particle size is a mathematical function that describes the degree
65 of reduction of a set of particles and is defined by measuring the relative
66 amounts of particles retained in varied sieves of known dimensions (Liu, 2008).
67 Particle size distribution analysis is desirable in several fields that handle
68 granular or particulate materials. Granulometry is a common method to
69 determine the particle size distribution of feed materials (Clementson and Ileleji,
70 2012), which can be performed with dry-sieving. The material passes through a
71 series of sieves, which are individually weighed and the proportion of material
72 retained on each sieve determined. Geometric mean particle size (**GMPS**) is the
73 most common method used for comparison of particle size distribution in cereal
74 grains (ASABE, 2007). Recently, GMPS has been suggested, in combination
75 with zein protein or ammonia-N, for modeling ruminal and total-tract starch
76 digestibilities and rate of ruminal starch digestion for dry and high-moisture
77 corns (Hoffman et al., 2012a). The GMPS of the kernel-fraction in WPCS has
78 not been well described and may provide valuable insights for modeling starch
79 digestibility in WPCS.

80 Thus, the objectives of this study were to evaluate: 1) particle size
81 distribution and ruminal in situ digestibility of unfermented kernels cut in varied
82 particle sizes; 2) a method to measure GMPS in WPCS kernels; and 3) the
83 relationship between CSPS and hydrodynamically separated kernel-fraction
84 GMPS in WPCS.

85

MATERIALS AND METHODS86 **Unfermented kernels**

87 Unfermented kernels from 110 corn hybrids from varied genetic lines
88 commonly used for silage production were obtained from previous experiments
89 in our laboratory. Kernels were collected from middle portions of ears at the
90 maturity stage between one-half and two-thirds of the milk line. All kernels were
91 previously dried at 40°C for 72 h in a forced-air oven. Kernels were kept whole
92 (**WH**) or manually cut in 2, 4, 8, 16, 32 or 64 pieces (**2P**, **4P**, **8P**, **16P**, **32P** and
93 **64P**, respectively) using scalpel blades (Surgical blade stainless steel n.21,
94 Feather Safety Razor Co, Ltd., Ozaka, Japan). First cut was done across the
95 kernel, and each subsequent halved a previously cut piece. A total of 330 kernels
96 (3 per hybrid) were obtained for each length of cut. Throughout the manuscript
97 these treatments will be referred to as particle number treatment. Each sample
98 (128.2 ± 7.0 g) was dry-sieved using a Tyler Ro-Tap Shaker (model RX-29,
99 Tyler, Mentor, OH) using a set of 9 sieves (W. S. Tyler) with nominal square
100 apertures of 9.50, 6.70, 4.75, 3.35, 2.36, 1.70, 1.18, 0.59 mm and pan (ASABE,
101 2007) to determine particle size distribution, and GMPS (μm) and surface area
102 (cm^2/g) were calculated using a log normal distribution (Baker and Herrman,
103 2002). Sieves were a combination of sieves used for CSPS (Ferreira and
104 Mertens, 2005; 9.50, 6.70, 4.75, 2.36, 1.18 and 0.59 mm sieves) or dry ground
105 corn GMPS (Baker and Herrman, 2002; 3.35 and 1.70 mm sieves). The

106 associated use of these 2 sets of sieves was chosen in an attempt to better
107 characterize and describe the particle-size distributions (% of DM retained on
108 each sieve).

109 Subsequently, in situ measurements of ruminal DM disappearance were
110 performed for each kernel particle number treatment using two ruminally-
111 cannulated mid-lactation multiparous Holstein cows fed a TMR containing (DM
112 basis) alfalfa silage (44.5%), non-experimental corn silage (26.8%), alfalfa hay
113 (10.7%), wheat straw (6.5%), and concentrate mixture (11.5%). Individual
114 samples of each kernel particle number treatment were recombined from each of
115 the sieves after dry-sieving procedures and evaluated for DM disappearance.
116 Dacron polyester cloth bags (R510, 10 x 20 cm and 50 μm pores; Ankom
117 Technology, Macedon, NY) containing approximately 5 g DM of each
118 unfermented kernel particle number treatment, yielding a ratio of sample mass
119 per bag area of 25 mg/cm^2 were incubated in duplicate within each cow. The in
120 situ bags for the respective treatments for each time-point (3, 6, 12, and 24 h)
121 were placed in a nylon laundry bag (30 x 40 cm) and then positioned in the
122 ventral rumen of each cow. Each laundry bag was attached to the inside of the
123 rumen cannula with a 75 cm long nylon rope and contained a rubber weight to
124 ensure they remained submerged in the ruminal contents. Bags were moistened
125 in warm water for 30 s prior to incubation. Each laundry bag contained a blank
126 bag to allow correction for infiltration of DM into sample bags. After removal,

127 samples were soaked in cold water for 15 min before washing twice in a
128 commercial washing machine (Whirlpool #3347019A, Whirlpool Corp., Benton
129 Harbor, MI) using the regular cycle rinse setting with cold water for 12 min
130 cycles (Cherney et al., 1990). Two bags for each treatment (0-h bags) were
131 soaked for 30 min in tepid water and washed with the rest of the sample bags.
132 Bags were dried together in a forced-air oven at 60°C for 48 h. The mean DM
133 disappearance value of the 2 bags on a treatment per incubation time was
134 calculated for each cow.

135 In situ data were analyzed using PROC MIXED (SAS Institute, 2004).
136 The model included the fixed effect of treatment, hour, and the interaction of
137 treatment and hour, and cow as a random effect. Statistical analyses were
138 performed on 0 h bags using PROC MIXED (SAS Institute, 2004) and the fixed
139 effect of treatment. Means were determined using the least squares means
140 statement and treatment means were compared using the Bonferroni's T-test
141 option after a significant overall treatment F-test. Bonferroni's T-test is a
142 sequentially rejective test based on the Holm-Bonferroni method (Holm, 1979).
143 Interaction effects were partitioned using the SLICE option (SAS Institute,
144 2004). Subsequently, regression analysis was performed using PROC REG of
145 SAS (SAS Institute, 2004) to determine linear and quadratic relationships
146 between ruminal in situ DM disappearance and GMPS or surface area. Analyses
147 were performed on all the individual time-point treatment means. Best-fit

148 regression (linear or quadratic) was chosen using the highest coefficient of
149 determination (R^2) and lowest root mean square error (**RMSE**) as indicators.
150 Statistical significance and tendencies were declared at $P \leq 0.05$ and $P > 0.05$ to
151 $P < 0.10$, respectively.

152 **Whole-plant corn silage**

153 Eighty WPCS samples from 2 feeding trials (Ferraretto and Shaver,
154 2012a; Vanderwerff et al., 2015) and a field survey of commercial farms (Salvati
155 et al., 2015) were selected to represent varied corn silage harvesting equipment,
156 processor types, and settings. Samples were frozen and stored at -20°C in all 3
157 studies and thawed overnight prior to sample analysis. Each WPCS sample was
158 placed in a bucket, homogenized manually and divided into two 1 kg
159 subsamples using a quartering technique: homogeneous samples were divided
160 into 4 equal subsamples. Two subsamples allocated diagonally were re-
161 homogenized and saved as 1 subsample, whereas the other two subsamples were
162 re-homogenized and saved as the other subsample. Each subsample was dried at
163 60°C for 48 h in a forced-air oven. On 1 of the subsamples, CSPS was
164 determined in duplicate as described by Ferreira and Mertens (2005). On the
165 other subsample, kernel and stover fractions were separated by a hydrodynamic
166 separation procedure (Savoie et al., 2004). This method is based on differences
167 in buoyancy between the kernels and stover. Each sample of approximately 400
168 g of DM was placed in a 10-L rectangular tub containing 7 L water. Each dried

169 sample was gently agitated manually for 2 minutes such that the entire sample
170 was submerged in water. After 2 minutes, the stover fraction which floats due to
171 a lower density than water was removed gently using a small 1.17 mm sieve
172 (Savoie et al., 2004). Subsequently, the water was poured out of the tub retaining
173 the kernel-fraction which has a density greater than water (Savoie et al., 2004).
174 After separation, the kernel-fraction was transferred to alluminium plates, re-
175 dried at 60°C for 48 h in a forced-air oven and dry-sieved using a Tyler Ro-Tap
176 Shaker (model RX-29, Tyler, Mentor, OH) with a set of 9 sieves having nominal
177 square apertures of 9.50, 6.70, 4.75, 3.35, 2.36, 1.70, 1.18, 0.59 mm and pan;
178 GMPS (μm) and surface area (cm^2/g) were calculated using a log normal
179 distribution (Baker and Herrman, 2002). All samples were recombined and
180 ground to pass through a 1-mm screen of a Wiley mill (Thomas Scientific,
181 Swedesboro, NJ) for starch, NDF and CP determination on hydrodynamically
182 separated WPCS kernel-fraction by near-infrared reflectance spectroscopy
183 (**NIRS**; model 6500; Foss-NIR System, Silver Spring, MD). Each sample was
184 packed into a cylindrical sample holder equipped with a quartz window (Part
185 number 60013287; Foss-NIR System, Silver Spring, MD) and scanned, between
186 400 and 2,498 nm, as described by Mentink et al. (2006). Prediction equations
187 for determining nutrient composition were obtained from the NIRS Forage and
188 Feed Test Consortium website (<http://nirsconsortium.org/>). These equations
189 were calibrated for CP (methods 984.13, 988.05 and 990.03; AOAC, 2012),

190 aNDF using α -amylase and sodium sulfite (method 2002.04; AOAC, 2012), and
191 starch (Bach Knudsen, 1997) using 754 ($R^2 = 0.88$), 1193 ($R^2 = 0.93$) and 320
192 ($R^2 = 0.97$) fermented WPCS samples, respectively, from participating
193 laboratories from all over the United States and collected over more than 20
194 years.

195 Regressions to determine linear and quadratic relationships between
196 CSPS in WPCS and hydrodynamically separated WPCS kernel-fraction GMPS,
197 surface area, and retained proportion on sieves of varied particle size were
198 performed using PROC REG of SAS (SAS Institute, 2004). Best-fit regression
199 (linear or quadratic) was chosen using the highest R^2 and RMSE as indicators.
200 Statistical significance and tendencies were declared at $P \leq 0.05$ and $P > 0.05$ to
201 $P < 0.10$, respectively.

202 Simulations were performed using the Feed Grain V2.0 Evaluation
203 System (Hoffman et al., 2012b) to predict the potential effect of GMPS on
204 extents of ruminal and total tract starch digestibilities and ruminal rate of starch
205 digestibility for dairy cows. The full model description can be accessed in the
206 model by Hoffman et al. (2012c). Briefly, the Feed Grain V2.0 Evaluation
207 System is based on the model proposed by Hoffman et al. (2012a) and uses
208 GMPS and ammonia-N or prolamin to predict starch digestibility of HMC or dry
209 corn, respectively. Hydrodynamically separated WPCS kernel-fraction GMPS
210 measurements from all samples were inputted in the model at a constant

211 ammonia-N concentration value (3.3% CP). Ammonia-N concentration was
212 arbitrarily chosen based on the average of ammonia-N values of high-moisture
213 corn samples with a similar storage length (Ferraretto et al., 2014).

214 **RESULTS AND DISCUSSION**

215 **Unfermented kernels**

216 Particle size distribution of unfermented kernels is in Table 1. As
217 designed, the distribution of particles among the different sieves varied widely
218 among particle number treatments. It was observed that each sieve retained more
219 than 1 particle number treatment. The least variation was observed for 8P with
220 88% of the particles retained on the 3.35 mm sieve. In contrast, 64P was the
221 most variable with material retained on 2.36, 1.70, 1.18 and 0.59 mm sieves, and
222 pan. This is related to wide variation in kernel size comprising the pool of
223 hybrids evaluated and the corresponding difference in particle size when small
224 and large kernels were cut in 64P. Kernel size naturally varies within and across
225 hybrids (Graven and Carter, 1990) and may be affected by varying vigor,
226 environmental conditions during pollination and fill period, kernel position in
227 the ear, and parent tendencies (EnayatGholizadeh et al., 2012; Mondo et al.,
228 2013). In addition, kernels were cut by hand and therefore samples from the
229 same kernel may vary in particle size. Ferreira and Mertens (2005) proposed
230 CSPS, proportion of starch passing through a 4.75 mm, as a quantitative
231 measure of kernel fragmentation in WPCS. These authors suggested that CSPS

232 represents the proportion of kernels that are broken in at least one-fourth of a
233 kernel. Our results, however, revealed that 60% of 4P kernels were retained on
234 the 4.75 mm sieve. Perhaps the the use of a broader hybrid pool in the present
235 study may explain the difference across studies.

236 Ruminal in situ DM digestibility of each particle number treatment of
237 unfermented kernels is in Table 2. Digestibility of DM in corn kernels is
238 strongly related to starch digestibility (Philippeau and Michalet-Doreau, 1999;
239 Ngonyamo-Majee et al., 2009), and thus served as a proxy for starch
240 digestibility in the present study. Treatments followed a similar pattern across all
241 time-points, but a treatment \times time interaction was observed ($P = 0.01$) as the
242 magnitude of response over time was different for the different treatments. A
243 negative quadratic relationship was observed between GMPS and ruminal in situ
244 DM digestibility for all time-points (Figure 1; $P < 0.01$) with the lowest R^2
245 observed at 3 h ($R^2 = 0.89$). Overall, ruminal DM digestibility increased ($P <$
246 0.01) with the reduction in particle size of corn kernels. Likewise, a positive
247 quadratic relationship was observed between surface area and ruminal in situ
248 DM digestibility for all time-points (Figure 2; $P < 0.01$) with lowest R^2 observed
249 at 3 h of incubation ($R^2 = 0.89$). Reduced GMPS increased total tract starch
250 digestibility in dry ground and high-moisture corn (Ferraretto et al., 2013).
251 Kernels kept whole had the lowest ruminal DM digestibility for all time-points
252 with a maximum DM digestibility of 6.9% at 24 h. The pericarp layer

253 surrounding the starch endosperm is highly resistant to microbial attachment
254 (McAllister et al., 1994) and likely inhibited DM digestibility in WH. Greatest
255 ruminal in situ DM digestibility was observed for 64P, followed by 32P and
256 16P, followed by a steady decrease in DM digestibility in 8P, 4P, 2P and WH.
257 As kernel fragmentation increases, greater surface area is available for
258 attachment of rumen microorganisms to starch granules and enzymatic digestion
259 (McAllister et al., 1993). Furthermore, reduced GMPS attenuates the negative
260 effects of the protein matrix encapsulating starch granules (Hoffman et al.,
261 2011), thereby resulting in greater starch digestion. Currently, the most common
262 method used to assess degree of kernel processing in WPCS is CSPS, which
263 considers all particles passing through a 4.75 mm sieve to be equal.
264 Nevertheless, dry-sieving revealed that 4P, 8P, 16P, 32P and 64P unfermented
265 kernel-fractions with different in situ disappearance passed through this sieve.
266 Differences in DM digestibility observed in the present study emphasize the
267 importance of a more descriptive particle size methodology for kernels. An
268 important aspect to consider is the use of unfermented kernels in the present
269 study, which are well known to be less digestible than fermented kernels
270 (Philippeau and Michalet-Doreau, 1998; Hoffman et al., 2011). Perhaps
271 differences in DM digestibility among the varied unfermented kernel particle
272 number treatments would be lower after ensiling. However, negative effects of

273 increased particle size on starch digestibility by dairy cows was reported for both
274 dry and ensiled corn in a recent meta-analysis (Ferraretto et al., 2013).

275 **Whole-plant corn silage**

276 Descriptive statistics for parameters measured on WPCS and
277 hydrodynamically separated WPCS kernel-fraction samples are in Table 3. As
278 expected based on the diversity of the sample set, all parameters varied widely.
279 The DM content of WPCS averaged 34.3% ranging from 25.5% to 47.1%, while
280 starch content averaged 33.6% with a range of 17.1% to 42.6%. The large
281 variance in DM and starch contents among WPCS samples was reflective of
282 various environmental factors and harvesting practices from the source trials and
283 farms. The CSPS of WPCS samples averaged 66.2% and ranged from 49.5 to
284 82.6%. Zwald et al. (2008), in a study with 81 WPCS samples from varied
285 hybrids and planting and harvest dates, reported an average CSPS of 58.9% with
286 a range of 24.5% to 89.7%. Several factors, including endosperm properties
287 (Correa et al., 2002), maturity (Johnson et al., 2002b) and degree of processing
288 (Bal et al., 2000) of WPCS alter the fragmentation of kernels and thereby the
289 digestibility of starch (Cooke and Bernard, 2005). The CSPS values observed in
290 the present study reflect the large variation that exists in the degree of kernel
291 processing in WPCS. Starch content of the hydrodynamically separated WPCS
292 kernel-fraction averaged 70.6% with an 11.8%-unit range (DM basis)
293 demonstrating that the hydrodynamic separation did not apparently interfere

294 greatly in the composition of the kernel-fraction. These data highlight that the
295 hydrodynamically separated WPCS kernels did not have contamination from
296 other fractions. Ferreira and Mertens (2005) reported an average starch content
297 of 63.7% (DM basis) in WPCS kernels that were hand-selected during the
298 development of the CSPA procedure. Philippeau and Michalet-Doureau (1997)
299 and Ngonyamo-Majee et al. (2008) studying the chemical and physical
300 characteristics of diverse corn hybrids reported average starch concentrations of
301 65.0% and 70.8% (DM basis), respectively, in unfermented WPCS kernels. In
302 the present study, concentrations of CP and NDF in the WPCS kernel-fraction
303 were $5.6 \pm 1.3\%$ and $11.0 \pm 1.7\%$, respectively. Ferraretto et al. (2014) reported
304 CP and NDF concentration in high-moisture corn to be $8.1 \pm 1.7\%$ and $7.1 \pm$
305 1.4% , respectively, in a retrospective study containing more than 6,000 samples.
306 The range in CP and NDF content in that study, however, was from 2.5% to
307 13.0% and 3.2% to 17.7% (R.D. Shaver, University of Wisconsin – Madison,
308 personal communication).

309 Relationships between WPCS CSPA and hydrodynamically separated
310 WPCS kernel-fraction particle size measurements are in Table 4. Linear
311 relationships between CSPA and hydrodynamically separated WPCS kernel-
312 fraction GMPS ($R^2 = 0.11$; $P = 0.01$) or surface area ($R^2 = 0.06$; $P = 0.03$) were
313 poor. A strong quadratic relationship ($R^2 = 0.96$) between CSPA and starch
314 GMPS was previously reported by Zwald et al. (2008). A positive linear

315 relationship between WPCS CSPA and the proportion of hydrodynamically
316 separated WPCS kernel-fraction passing through the 4.75 mm screen was
317 observed in the present study although the relationship was weak ($R^2 = 0.34$; $P =$
318 0.001). A distribution plot of CSPA and proportion of hydrodynamically
319 separated WPCS kernel-fraction passing through the 4.75 mm sieve (Figure 3)
320 suggests that CSPA may underestimate starch passage through the 4.75 mm
321 sieve. Because the CSPA uses a dried whole-sample, fine starch particles may be
322 retained on coarse fiber particles. This may explain the strong quadratic
323 relationship observed by Zwald et al. (2008) when measuring starch GMPS in
324 whole-samples. In the study of Zwald et al. (2008) NIRS was utilized to predict
325 particle size of starch within undried, unground corn silage and verified that
326 some physical characteristics also interfered in the accuracy of predictions.
327 When spectra was obtained from samples without particles greater than 19-mm
328 the prediction was improved. According to these authors, long forage particles
329 and cobs retained on a 19-mm sieve could contain some fine particles of starch
330 that might influence the capability of NIRS to properly predict the physical
331 characteristics of the kernel-fraction of WPCS. Our data showed that the CSPA
332 was inversely related to hydrodynamically separated WPCS kernel-fraction
333 material retained on 4.75 mm ($R^2 = 0.26$; $P = 0.001$) sieves as expected.
334 Evaluation of fractions retained on individual sieves below the 4.75 mm sieve
335 revealed a positive, but poor relationships between CSPA and 3.35 ($R^2 = 0.20$; P

336 < 0.01), 2.36 ($R^2 = 0.47$; $P < 0.01$), and 1.70 mm ($R^2 = 0.14$; $P < 0.01$) sieves
337 and pan ($R^2 = 0.26$; $P = 0.02$). Corn silage processing score was not related ($P >$
338 0.10) to hydrodynamically separated WPCS kernels retained on 1.18 and 0.59
339 mm sieves.

340 Among all evaluated hydrodynamically separated kernel-fractions in
341 WPCS, the particles retained on the 2.36 mm sieve not the 4.75 mm screen had
342 the highest relationship with CSPS. Thus, the proportion of particles retained on
343 this screen was evaluated as a possible single screen predictor of GMPS and
344 surface area of hydrodynamically separated WPCS kernels (Table 5). A
345 quadratic relationship was observed ($P = 0.01$), but the relationship was
346 relatively weak, for both GMPS ($R^2 = 0.16$) and surface area ($R^2 = 0.06$). Zwald
347 et al. (2008) also observed low prediction of CSPS when using data of WPCS
348 particles retained on a single screen. In addition, these authors reported
349 difficulties using NIRS to predict particles retained on 4.75 and 3.35 mm
350 vertical shaker screens.

351 The relationship between the proportion of hydrodynamically separated
352 WPCS kernel particles passing through the 4.75 mm screen and
353 hydrodynamically separated GMPS of WPCS kernels or surface area are in
354 Table 5. Strong quadratic relationships between proportion of hydrodynamically
355 separated WPCS kernel-fraction passing through the 4.75 mm screen and GMPS
356 ($R^2 = 0.69$; $P < 0.01$) and surface area ($R^2 = 0.54$; $P < 0.01$) were observed.

357 Baker and Herrman (2002) found that surface area of kernel particles is an
358 exponential function of GMPS. In this study, an increase in particles passing
359 through 4.75 mm sieve was strongly associated with a decrease in the GMPS.
360 Nevertheless, the relationship between hydrodynamically separated WPCS
361 kernel particles passing through the 4.75 mm sieve and surface area was lower.
362 This observation is expected because samples containing different proportions of
363 varied particle sizes result in different surface area values. The particle size of
364 kernel-fractions in WPCS is important because it can influence the digestion of
365 starch, which is the main source of digestible energy in WPCS. There is high
366 demand for improved accuracy of predicting WPCS starch digestibility using
367 laboratory assays such as CSPS. Considering the great diversity in shape and
368 size of the kernels in hybrids used for WPCS production, to define kernel
369 processing based on the proportion of starch that passes through the 4.75 mm
370 sieve may not be accurate. However, CSPS remains an useful tool to evaluate
371 kernel processing in WPCS until a new method is fully adopted by commercial
372 laboratories. Additionally, the use of a single larger screen may lead to an
373 underestimation of the kernel digestibility; whereas the use of a single smaller
374 screen may overestimate the digestion potential of the kernel fraction of WPCS.
375 Total tract starch digestibility of corn silage based diets is highly variable
376 (Ferraretto and Shaver, 2012b). This variation can be partially explained by the
377 particle size of the kernel-fraction. However, building relationships between

399 breakage in WPCS. The use of these procedures in combination with the Feed
400 Grain V2.0 Evaluation System may enhance the modeling of starch digestibility
401 in WPCS and further research is warranted.

402 **ACKNOWLEDGMENTS**

403 The authors are grateful to the Brazilian Federal Agency for Post-
404 graduate Education (CAPES) for the financial support to G. S. Dias Júnior.
405 Appreciation is also extended to Dr. Dan Undersander (Department of
406 Agronomy, University of Wisconsin – Madison) for the opportunity to use his
407 laboratory and NIRS equipment for nutrient analysis.

408 **REFERENCES**

- 409 AOAC International. 2012. Official Methods of Analysis 19th ed. Assoc. Off.
410 Anal. Chem., Arlington, VA.
- 411 ASABE. 2007. Method of determining and expressing fineness of feed materials
412 by sieving. ANSI/ASAE S319.4:646–649.
- 413 Bach Knudsen, K. E. 1997. Carbohydrate and lignin contents of plant materials
414 used in animal feeding. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67:319-338.
- 415 Bal, M. A., R. D. Shaver, A. G. Jirovec, K. J. Shinnors, and J. G. Coors. 2000.
416 Crop processing and chop length of corn silage: Effects on intake,
417 digestion, and milk production by dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:1264-1273.

- 418 Baker, S., and T. Herrman. 2002. Evaluating particle size. MF-2051. Kansas
419 State Univ., Manhattan, KS.
- 420 Cherney, D. J. R., J. A. Patterson, and R. P. Lemenager. 1990. Influence of in
421 situ bag rinsing technique on determination of dry matter disappearance. *J.*
422 *Dairy Sci.* 73:391-397.
- 423 Clementson, C. L., and K. E. Ileleji. 2012. Particle heterogeneity of corn
424 distillers dried grains with solubles (DDGS). *Bioresource Tech.* 107:213-
425 221.
- 426 Cooke, K. M., and J. K. Bernard. 2005. Effect of kernel processing and
427 theoretical length of cut of corn silage on performance of lactating dairy
428 cows. *J. Dairy Sci.* 88:310-316.
- 429 Correa, C. E. S., R. D. Shaver, M. N. Pereira, J. G. Lauer, K. Kohn. 2002.
430 Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch
431 degradability. *J. Dairy Sci.* 85:3008-3012.
- 432 EnayatGholizadeh, M. R., A. M. Bakhshandeh, M. D. Shoar, M. H. Ghaineh, K.
433 H. A Saeid, and M. Sharafizadeh. 2012. Effect of source and seed size on
434 yield component of corn S.C704 in Khuzestan. *African J. of Biotech.*
435 11:2938-2944.
- 436 Ferraretto, L. F., P. M. Crump, and R. D. Shaver. 2013. Effect of cereal grain
437 type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion,

- 438 and milk production by dairy cows through a meta-analysis. *J. Dairy Sci.*
439 96:533-550.
- 440 Ferraretto, L. F., and R. D. Shaver. 2012a. Effect of corn shredlage on lactation
441 performance and total tract starch digestibility by dairy cows. *Prof. Anim.*
442 *Sci.* 28:639-647.
- 443 Ferraretto, L. F., and R. D. Shaver. 2012b. Meta-analysis: Effect of corn silage
444 harvest practices on intake, digestion, and milk production by dairy cows.
445 *Prof. Anim. Sci.* 28:141-149.
- 446 Ferraretto, L. F., K. Taysom, D. Taysom, R. D. Shaver, and P. C. Hoffman.
447 2014. Relationship between dry matter content, ensiling, ammonia-
448 nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn
449 samples. *J. Dairy Sci.* 97:3221-3227.
- 450 Ferreira, G., and D. R. Mertens. 2005. Chemical and physical characteristics of
451 corn silages and their effects of in vitro disappearance. *J. Dairy Sci.*
452 88:4414-4425.
- 453 Graven, L. M., P. R. Carter. 1990. Seed size, shape and tillage system effect on
454 corn growth and grain yield. *J. Prod. Agric.* 3:455-452.
- 455 Hoffman, P. C., N. M. Esser, R. D. Shaver, W. K. Coblenz, M. P. Scott, A. L.
456 Bodnar, R. J. Schmidt, R. C. Charley. 2011. Influence of ensiling time and

- 457 inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn.
458 J. Dairy Sci. 94:2465-2474.
- 459 Hoffman, P. C., D. R. Mertens, J. Larson, W. K. Coblenz, and R. D. Shaver.
460 2012a. A query for effective mean particle size of dry and high moisture
461 corns. J. Dairy Sci. 95:3467-3477.
- 462 Hoffman, P. C., R. D. Shaver, and D. R. Mertens. 2012b. Feed Grain V2.0
463 Evaluation System.
464 <http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/spreadsheets.cfm> Accessed on Jul,
465 8th 2015.
- 466 Hoffman, P. C., R. D. Shaver, and D. R. Mertens. 2012c. Feed Grain V2.0
467 Evaluation System Background and Development Guide.
468 [http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/documents/Background-](http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/documents/Background-DevelopmentGuidev2.0b.pdf)
469 [DevelopmentGuidev2.0b.pdf](http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/documents/Background-DevelopmentGuidev2.0b.pdf) Accessed on Aug, 14th 2015.
- 470 Holm, S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand. J.
471 Stat. 6:65-70.
- 472 Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: From basics to the
473 bunk. J. Anim. Sci. 75:852-867.
- 474 Johnson, L. M., J. H. Harrison, D. Davidson, J. Robutti, M. Swift, B. Mahanna,
475 K. Shinnars. 2002. Corn silage management I: Effects of hybrid, maturity,

- 476 and mechanical processing on chemical and physical characteristics. J.
477 Dairy Sci. 85:833-853.
- 478 Liu, K. S. 2008. Particle size distribution of distillers dried grains with solubles
479 (DDGS) and relationships to compositional and color properties.
480 Bioresource Tech. 99: 8421-8428.
- 481 McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones and K. J. Cheng. 1994. Microbial
482 attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72:3004-3018.
- 483 McAllister, T. A., R. C. Phillippe, L. M. Rode, and K-J. Cheng. 1993. Effect of
484 the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal
485 microorganisms. J. Anim. Sci. 71:205.
- 486 Mentink, R. L., P. C. Hoffman, and L. M. Bauman. 2006. Utility of near-
487 infrared reflectance spectroscopy to predict nutrient composition and in
488 vitro digestibility of total mixed rations. J. Dairy Sci. 89:2320–2326.
- 489 Moore, S. M, K. J. Stalder, D. C. Beitz, C. H. Stahl, W.A. Fithian, and K.
490 Bregendahl. 2008. The correlation of chemical and physical corn kernel
491 traits with growth performance and carcass characteristics in pigs. J. Anim.
492 Sci. 86:592-601.
- 493 Mondo, V. H. V., S. M. Cicero, D. Dourado-Neto, T. Pupim, and M. A. N. Dias.
494 2013. Effect of seed vigor on intraspecific competition and grain yield in
495 maize. Agron. J. 105:222-228.

- 496 National Research Council. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th rev.
497 ed. Natl. Acad. Sci., Washington D.C.
- 498 Ngonyamo-Majee, D., R. D. Shaver, J. G. Coors, D. Sapienza, and J. G. Lauer.
499 2008. Relationships between kernel vitreousness and dry matter
500 degradability for diverse corn germplasm: II. Ruminant and post-ruminal
501 degradabilities. *Anim. Feed Sci. Technol.* 142:259-274.
- 502 Ngonyamo-Majee, D., R. D. Shaver, J. G. Coors, D. Sapienza, and J. G. Lauer.
503 2009. Influence of single-gene mutations, harvest maturity and sample
504 processing on ruminal in situ and post-ruminal in vitro dry matter and
505 starch degradability of corn grain by ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*
506 151:240-259.
- 507 Nocek J. E., and S. Tamminga. 1991. Site of digestion of starch in the
508 gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and
509 composition. *J. Dairy Sci.* 74:3598-3629.
- 510 Philippeau, C., and B. Michalet-Doreau. 1997. Influence of genotype and stage
511 of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation *Anim. Feed Sci.*
512 *Technol.* 68:25-35.
- 513 Philippeau, C., and B. Michalet-Doreau. 1998. Influence of genotype and
514 ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. *J. Dairy*
515 *Sci.* 81:2178–2184.

- 516 Philippeau, C., and B. Michalet-Doreau. 1999. Relationship between ruminal
517 starch degradation and the physical characteristics of corn grain. *J. Anim.*
518 *Sci.*77: 238-243.
- 519 Salvati, G. G. S., L. F. Ferraretto, R. D. Shaver, M. Lippert, E. Ronk, and
520 C. Wacek-Driver. 2015. Corn silage processing: Dairy farm survey. *In:*
521 *Proc. XVII International Silage Conference, Piracicaba, SP, Brazil.*
- 522 SAS Institute. 2004. *SAS/STAT 9.1 User's Guide. Version 9.1 ed, Cary, NC.*
- 523 Savoie, P., K. J. Shinnors and B. N. Binversie. 2004. Hydrodynamic separation
524 of grain and stover components in corn silage. *Appl. Biochem. and*
525 *Biotechnol.* 113:41-54.
- 526 Seglar, W. J., and R. D. Shaver. 2014. Management and assessment of ensiled
527 forages and high-moisture grain. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*
528 30:507-538.
- 529 Shinnors, K. J., A. G. Jirovec, R. D. Shaver, and M. Bal. 2000. Processing
530 whole-plant corn silage with crop processing rolls on a pull-type forage
531 harvester. *Appl. Eng. Agric.* 16:323-331.
- 532 Vanderwerff, L. M., L. F. Ferraretto, and R. D. Shaver. 2015. Brown midrib
533 corn shreddage in diets for high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*
534 98:5642-5652.

- 535 Zwald, A., A. E. Dorshorst, P.C. Hoffman, L.M. Bauman, M.G. Bertram. 2008.
536 Technical Note: A near infrared reflectance spectroscopy technique to
537 predict particle size of starch within corn silage. *J. Dairy Sci.* 91: 2071-
538 2076.

539 Table 1. Particle size distribution, geometric mean particle size (GMPS) and surface area
 540 of unfermented kernels.¹

<u>Item</u>	WH	2P	4P	8P	16P	32P	64P
<u>Sieves, mm²</u>							
9.50	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6.70	79.71	20.71	0.63	0.00	0.00	0.00	0.00
4.75	20.29	78.16	60.50	5.57	0.14	0.00	0.00
3.35	0.00	0.67	38.34	87.98	15.81	0.57	0.00
2.36	0.00	0.00	0.20	5.01	74.23	53.74	3.97
1.70	0.00	0.00	0.02	0.18	7.78	43.42	65.01
1.18	0.00	0.07	0.04	0.06	0.69	1.68	20.35
0.59	0.00	0.18	0.10	0.67	0.90	0.28	6.80
Pan	0.00	0.21	0.15	0.52	0.45	0.31	3.85
GMPS, μm	7556.7	6074.9	4980.8	3953.4	2866.7	2413.7	1683.3
Surface area, cm^2/g	3.6	6.5	8.9	11.9	15.9	17.8	23.2

541 ¹Kernels were kept whole (WH) or broken in 2, 4, 8, 16, 32 or 64 pieces (2P, 4P, 8P,
 542 16P, 32P, and 64P, respectively).

543 ²Percentage of particles retained on each sieve (DM basis).

544 Table 2. Ruminal in situ DM disappearance (% of DM) of unfermented kernels.^{1,2,3}

<u>Item</u>	WH	2P	4P	8P	16P	32P	64P	SEM ⁴	P-value
<u>Time-point, h</u>									
0	4.6 ^d	4.8 ^d	6.1 ^c	4.9 ^d	6.8 ^{bc}	7.5 ^b	10.0 ^a	0.5	0.01
3	4.0 ^c	8.2 ^b	10.6 ^b	10.0 ^b	14.9 ^b	16.4 ^{ab}	23.6 ^a	6.1	0.03
6	4.5 ^d	10.9 ^c	16.7 ^{bc}	20.0 ^b	25.3 ^{ab}	29.2 ^a	34.6 ^a	6.1	0.001
12	4.9 ^f	15.9 ^e	29.3 ^{de}	43.2 ^d	48.7 ^c	50.8 ^b	53.0 ^a	5.3	0.001
24	6.9 ^e	39.2 ^d	50.5 ^c	64.7 ^b	72.7 ^{ab}	71.3 ^a	73.3 ^a	6.1	0.001

545 ^{a,b,c,d,e}Means in the same row with different superscripts differ ($P \leq 0.05$).546 ¹Kernels were kept whole (WH) or broken in 2, 4, 8, 16, 32 or 64 pieces (2P, 4P, 8P,
547 16P, 32P, and 64P, respectively).548 ²Hour ($P = 0.001$) and treatment by hour ($P = 0.001$) effects.549 ³Blank-bag weights before and after incubations were 3.07 g (± 0.08) and 3.10 g (\pm
550 0.08), respectively.551 ⁴Greatest standard error of the mean.

552 Table 3. Descriptive statistics of nutrient composition and corn silage processing score
 553 (CSPS) in whole-plant corn silage and hydrodynamically separated kernel-fraction
 554 nutrient composition, particle size distribution, surface area and geometric mean particle
 555 size (GMPS).

Item	Mean	SD	Min	Max
<u>Whole-Plant Corn silage</u>				
DM, % of as fed	34.3	3.9	25.5	47.1
Starch, % of DM	33.6	5.6	17.1	42.6
CSPS, ¹ % starch passing through 4.75 mm sieve	66.3	6.1	49.5	82.7
<u>Kernel Fraction</u>				
CP, % of DM	5.6	1.3	3.8	9.5
NDF, % of DM	11.0	1.7	7.7	16.6
Starch, % of DM	70.6	2.80	63.9	75.7
GMPS, μm	2637.5	862.7	1614.9	7556.7
Surface area, cm^2/g	21.4	4.2	3.6	28.4
<u>Kernel Fraction retained on each sieve, %²</u>				
6.70	5.5	4.4	0.4	25.7
4.75	20.7	5.7	8.7	33.5
3.35	18.6	3.3	11.1	30.0
2.36	15.3	2.8	9.1	23.8
1.70	11.5	1.6	6.9	15.1
1.18	8.9	1.6	5.7	14.5
0.59	10.4	2.4	5.8	19.2
Pan	9.0	2.8	3.6	18.3

556 ¹CSPS as in Ferreira and Mertens (2005).

557 ²None of the samples had material retained in the 9.50 mm sieve.

558 Table 4. Linear relationship between corn silage processing score (% starch passing
 559 through a 4.75 mm sieve) in whole-plant corn silage and hydrodynamically separated
 560 kernel-fraction geometric mean particle size (GMPS), surface area, and retained
 561 proportion on sieves of varied particle size.

<u>Predicted</u>	Parameter Estimates				Model Statistics		
	Intercept	SE ¹	Slope	SE	<i>P</i> -value	R ²	RMSE ²
GMPS, μm	3969.92	479.52	-22.61	3969.92	0.01	0.11	389.84
Surface area, cm^2/g	15.70	2.94	0.10	15.70	0.02	0.06	2.38
<u>Particles retained, ³ mm</u>							
4.75	52.50	6.10	-0.482	52.50	<0.01	0.26	4.95
3.35	2.55	3.65	0.242	2.55	<0.01	0.20	2.97
2.36	-5.38	2.50	0.312	-5.38	<0.01	0.47	2.03
1.70	5.11	1.82	0.096	5.11	<0.01	0.14	1.48
1.18	6.35	1.92	0.039	6.35	0.18	0.02	1.55
0.589	5.77	2.95	0.070	5.77	0.12	0.03	2.39
Pan	0.82	3.40	0.123	0.82	0.02	0.07	2.75
<4.75	67.75	4.45	0.403	67.75	<0.01	0.34	3.61

562 ¹Standard error.

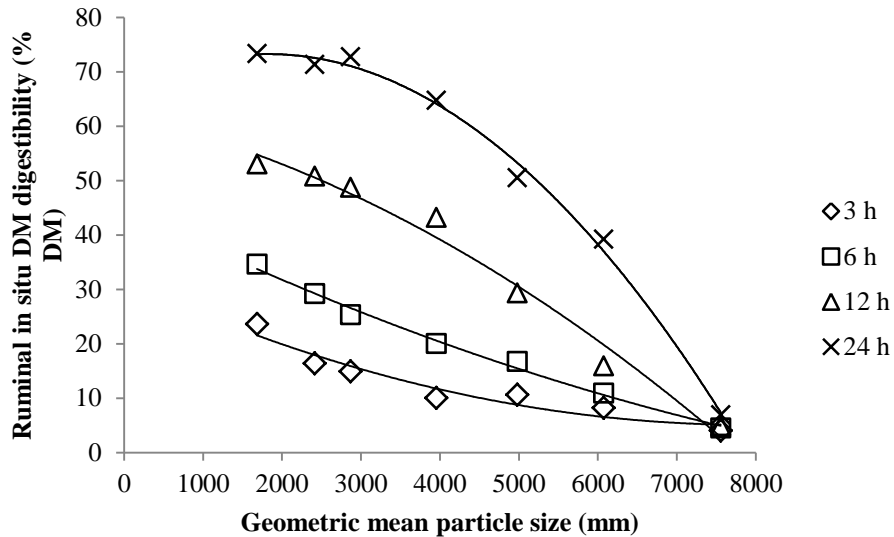
563 ²Root mean square error.

564 ³Percentage of particles retained on each sieve (DM basis).

565 Table 5. Quadratic relationships between hydrodynamically separated kernel particles retained at 2.36 mm sieve or
 566 passing through the 4.75 mm sieve and hydrodynamically separated kernel-fraction geometric mean particle size (GMPS,
 567 μm) and surface area (cm^2/g).

Predicted (y)	Predictor (x)	Parameter Estimates				Model Statistics		
		Intercept	SE ¹	Slope	SE	P-value	R ²	RMSE ²
% of particles retained at 2.36 mm sieve	GMPS	5453.13	929.02	-346.38	121.07	<0.01	0.16	377.41
	GMPS ²			9.60	3.89			
% of particles retained at 2.36 mm sieve	Surface area	8.65	5.86	1.66	0.76	0.04	0.06	2.38
	Surface area ²			-0.05	0.03			
% of particles passing 4.75 mm sieve	GMPS	8262.72	1201.04	-124.93	33.98	<0.01	0.69	228.81
	GMPS ²			0.62	0.24			
% of particles passing 4.75 mm sieve	Surface area	0.57	8.79	0.41	0.25	<0.01	0.54	1.67
	Surface area ²			-0.001	0.002			

568 ¹Root mean square error.



569

570

571

572

573

574

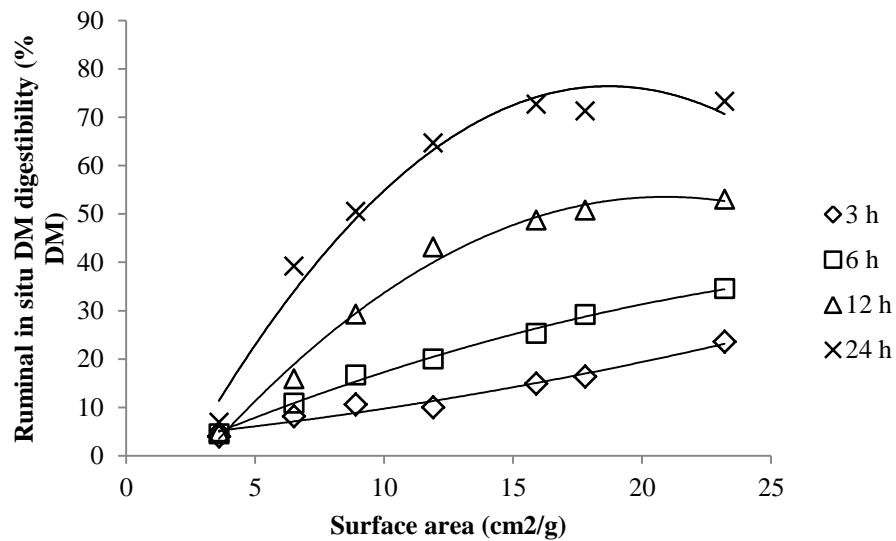
575

576

577

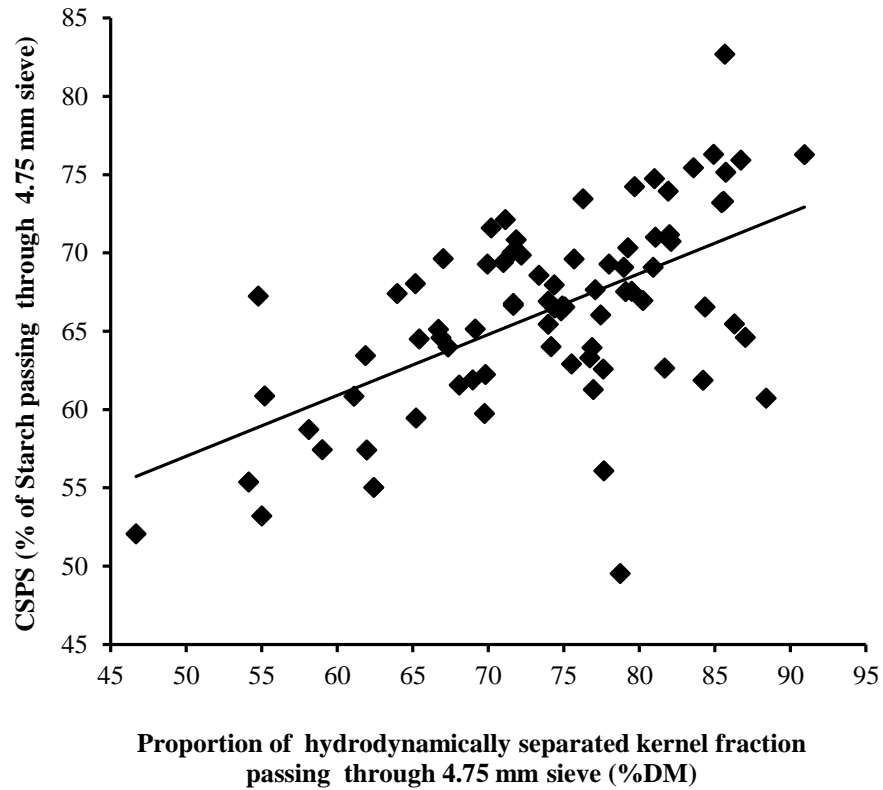
578

Figure 1. Relationship between ruminal in situ DM disappearance (% of DM) and geometric mean particle size (μm) in unfermented kernel. Prediction equation for 3 h: $y = 31.58 (\pm 4.53) - 0.007 x (\pm 0.01) - 4.170 x^2 (\pm 2.42)$; $n = 7$, $\text{RMSE} = 2.10$, $R^2 = 0.89$, $P = 0.01$. Prediction equation for 6 h: $y = 45.11 (\pm 2.42) - 0.007 x (\pm 0.01) - 2.428 x^2 (\pm 1.21)$; $n = 7$, $\text{RMSE} = 1.05$, $R^2 = 0.99$, $P = 0.001$. Prediction equation for 12 h: $y = 62.13 (\pm 6.74) - 0.004 x (\pm 0.01) - 5.909 x^2 (\pm 3.60)$; $n = 7$, $\text{RMSE} = 3.12$, $R^2 = 0.97$, $P = 0.001$. Prediction equation for 24 h: $y = 66.65 (\pm 4.47) + 0.001 x (\pm 0.01) - 0.001 x^2 (\pm 2.39)$; $n = 7$, $\text{RMSE} = 2.07$, $R^2 = 0.99$, $P = 0.001$.



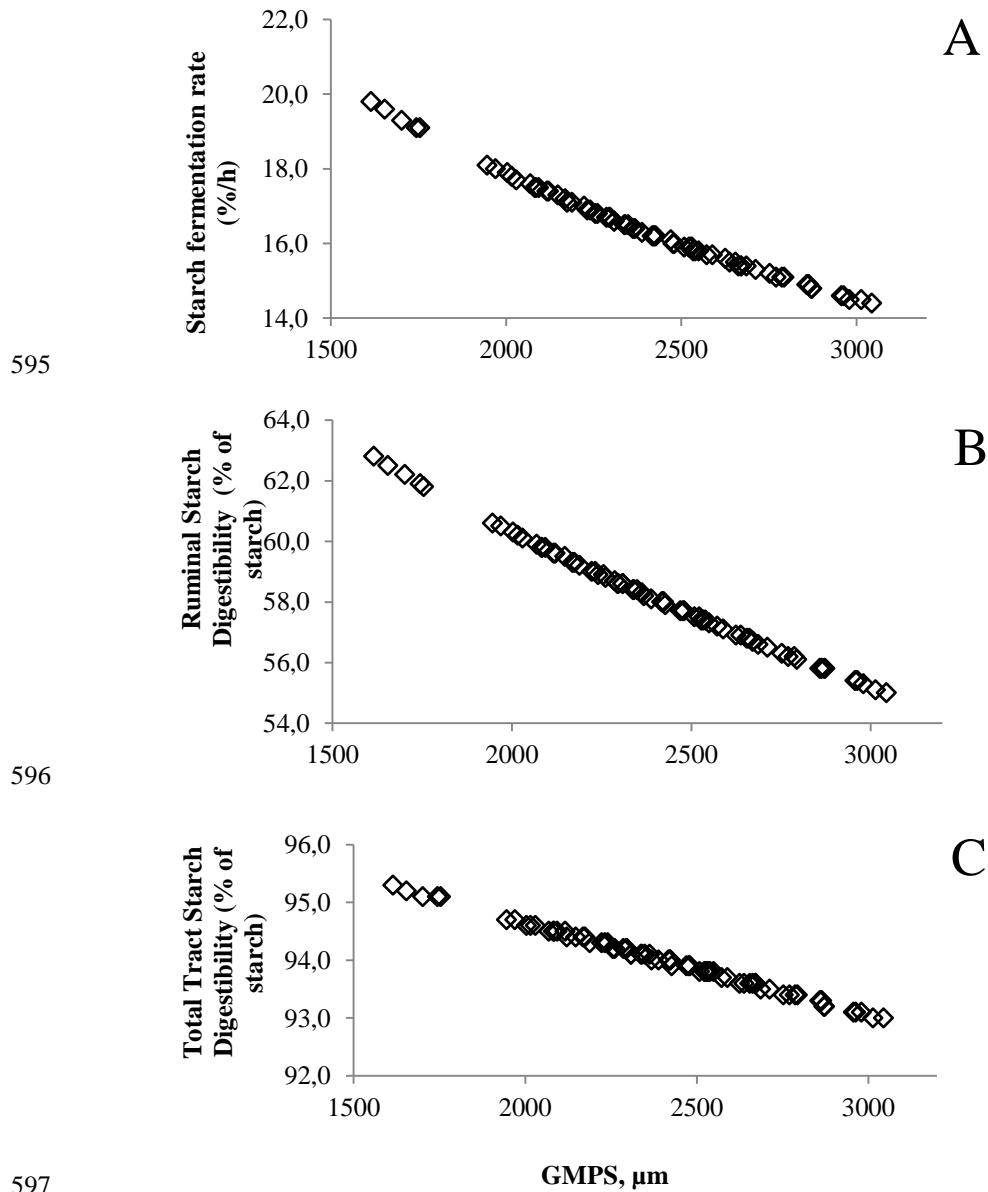
579

580 Figure 2. Relationship between ruminal in situ DM disappearance (% of DM)
 581 and surface area (cm²/g) in unfermented kernel. Prediction equation for 3 h: $y =$
 582 $3.15 (\pm 2.25) + 0.507 x (\pm 0.39) + 0.015 x^2 (\pm 0.01)$; $n = 7$, $RMSE = 0.40$, $R^2 =$
 583 0.95 , $P = 0.001$. Prediction equation for 6 h: $y = -3.186 (\pm 1.50) + 5.130 x (\pm$
 584 $0.38) - 0.117 x^2 (\pm 0.01)$; $n = 7$, $RMSE = 0.93$, $R^2 = 0.99$, $P = 0.001$. Prediction
 585 equation for 12 h: $y = -19.44 (\pm 3.87) + 6.979 x (\pm 0.66) - 0.167 x^2 (\pm 0.02)$; $n =$
 586 7 , $RMSE = 2.41$, $R^2 = 0.98$, $P = 0.001$. Prediction equation for 24 h: $y = -23.30$
 587 $(\pm 7.40) + 10.660 x (\pm 1.27) - 0.285 x^2 (\pm 0.05)$; $n = 7$, $RMSE = 4.60$, $R^2 = 0.96$,
 588 $P = 0.001$.



589

590 Figure 3. Relationship between corn silage processing score (CSPS: % of starch
 591 passing through 4.75 mm sieve) and proportion of hydrodynamically separated
 592 kernel-fraction passing through 4.75 mm sieve in whole-plant corn silage. Corn
 593 silage processing score prediction equation: $y = 37.55 (\pm 4.54) + 0.39x (\pm 0.06)$;
 594 $n = 80$, $RMSE = 4.96$, $R^2 = 0.34$, $P < 0.01$.



598 Figure 4. Simulations of the effect of kernel-fraction geometric mean particle
 599 size (μm) on starch fermentation rate (%/h; Panel A) and ruminal and total tract
 600 starch digestibilities (% of starch; Panel B and C, respectively) performed using
 601 the Feed Grain V2.0 Evaluation System.