



**NAINA MAGALHÃES LOPES**

**EFEITO DE ENZIMAS NA DIGESTIBILIDADE  
RUMINAL E PERDA DE MATÉRIA SECA DA  
SILAGEM DO GRÃO DE MILHO REIDRATADO**

**LAVRAS – MG  
2016**

**NAINA MAGALHÃES LOPES**

**EFEITO DE ENZIMAS NA DIGESTIBILIDADE RUMINAL E PERDA  
DE MATÉRIA SECA DA SILAGEM DO GRÃO DE MILHO  
REIDRATADO**

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

Orientador

Prof. Marcos Neves Pereira

**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).**

Lopes, Naina Magalhães.

Efeito de enzimas na digestibilidade ruminal e perda de matéria  
seca da silagem do grão de milho reidratado: N/A / Naina  
Magalhães Lopes. – Lavras: UFLA, 2016.  
114 p.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.  
Orientador(a): Marcos Neves Pereira.  
Bibliografia.

1. Enzima. 2. Produção de gás. 3. Prolamina. I. Universidade  
Federal de Lavras. II. Título.

**NAINA MAGALHÃES LOPES**

**EFEITO DE ENZIMAS NA DIGESTIBILIDADE RUMINAL E PERDA  
DE MATÉRIA SECA DA SILAGEM DO GRÃO DE MILHO  
REIDRATADO**

**EFFECT OF ENZYME ON RUMEN DIGESTIBILITY AND DRY  
MATTER LOSS FROM REHYDRATED GRAIN CORN SILAGE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 14 de setembro de 2016.  
Dra. Carla Luiza da Silva Ávila  
Dr. Felipe Cardoso de Cardoso  
Dra. Marina de Arruda Camargo Danés  
Dra. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

Prof. Marcos Neves Pereira  
Orientador

**LAVRAS - MG**

**2016**

*À minha mãe, Nelma,  
à minha irmã, Arina,  
ao Roberto,  
à minha tia Nara e  
In memoriam  
ao meu pai, Airton e  
à minha avó, Neusa*

## **DEDICO**

*Valores...*

*“A vitória só é completa quando vem acompanhada de  
um abraço de quem se ama.”*

## AGRADECIMENTOS

À minha família, que é tudo pra mim, agradeço por compreenderem que para concluir meus estudos tive que me ausentar.

Ao professor Marcos Neves, pelo exemplo de profissional, pelos ensinamentos e pela paciência ao me orientar por todos esses 10 anos.

À Renata, por sua disponibilidade em ajudar sempre.

Aos membros da banca examinadora Carla Ávila, Felipe Cardoso, Marina Danés e Renata Apocalypse, por terem dedicado ao meu trabalho algo muito precioso, o seu tempo.

Ao Gilson Dias, meu mais que amigo, meu anjo da guarda que tanto me ensinou e me guiou no caminho da bovinocultura leiteira.

À Família Grupo do Leite que me acolheu, ensinou e ajudou na definição do meu caráter e conhecimento profissional.

Aos colegas e amigos de pós-graduação: José Ricardo, Nilson Moraes, Ronaldo Lima, Ozana Zacaroni, Vitor Silveira, Willian Santos, Rafael Caputo, Gustavo Salvatti, Eugênio Faria, Julia Dias, Karina Toledo, Fabiana Cardoso, Douglas Duarte, Lucas de Castro, Ricardo Peixoto, com todos aprendi alguma coisa e muito contribuíram na conclusão dessa fase.

À fazenda São Francisco e seus funcionários, Cesar, Carlos, Sebastião e Geraldo que foram indispensáveis para a realização dos experimentos e os quais muito admiro pela força de vontade e coragem de encarar os desafios diários.

À University of Illinois, por me receber como aluna no programa sanduíche. Ao professor Felipe Cardoso pela paciência e dedicação com que me ensinou e orientou não apenas no meio acadêmico, mas na vida. Aos integrantes do Dairy Focus Team que me receberam nos Estados Unidos com muito carinho e me ajudaram nas dificuldades do dia a dia.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos, apoiando financeiramente a realização desta pós-graduação. À Capes pela bolsa no programa Ciências Sem Fronteiras.

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

## RESUMO GERAL

Três experimentos avaliaram enzimas para aumentar a digestibilidade ruminal *in vitro* da silagem de grão de milho maduro moído, reidratado e ensilado (REC). Também foram avaliados os efeitos do tamanho das partículas (PS, fino ou grosso), da duração do armazenamento (D) e do tipo do endosperma (H, duro ou farináceo). No Exp. 1, os tratamentos Control,  $\alpha$  Amylase 1 e  $\alpha$  Amylase 2 foram combinados com Control, Amyloglucosidase 1, Protease 1 e Fibrolytic, armazenados por 81 d. No Exp. 2 avaliou-se os efeitos de H, do PS, do uso de enzimas ( $\alpha$  Amylase 3, Protease 2 e  $\alpha$  Amylase 3 + Protease 2) e de D (30, 90, 120 d). No Exp. 3 avaliou-se os efeitos do uso de enzimas (Control, Amyloglucosidase 2), do PS e de D (30, 250 d). As enzimas mais promissoras para aumentar a digestibilidade ruminal da REC foram amiloglicosidase, que aumentou o tamanho da fração rapidamente digestível e a degradação efetiva no rúmen. Entretanto, esta enzima aumentou a perda de matéria seca na ensilagem e reduziu o teor de amido. E a protease, que reduziu o teor de prolamina na REC e aumentou a degradação efetiva no rúmen.

**Palavras-chave:** Amido. Digestibilidade ruminal *in vitro*. Prolamina

## ABSTRACT

Three experiments evaluated the addition of enzymes to increase the ruminal *in vitro* digestibility of mature ground corn, rehydrated, and ensiled (REC). The effects of particle size (PS; fine or coarse), duration of storage (D), and type of endosperm (H; flint or floury) were also evaluated. In Exp. 1, treatments Control,  $\alpha$  Amylase 1, and  $\alpha$  Amylase 2 with Control, Amyloglucosidase 1, Protease 1, and Fibrolytic, stored for 81 d. In Exp. 2 was evaluated the effects of H, PS, enzyme ( $\alpha$  Amylase 3, Protease 2,  $\alpha$  Amylase 3 + Protease 2) and D (30 d, 90 d, 120 d). Exp. 3 evaluated the effects of enzyme (Control, Amyloglucosidase 2), PS and D (30 d, 250 d). The most promising enzymes for improving REC digestibility were amyloglucosidase and protease. Amyloglucosidase increased the size of the fast digestible fraction and the effective ruminal degradation. However, this enzyme increase the loss of DM during ensiling and reduced starch concentration in feed. Protease reduced the content of prolamin in REC and increased the fractional degradation rate and the effective ruminal degradation.

**Key Words:** Flint corn. *In vitro* ruminal digestibility. Prolamin.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Estrutura química da amilose e amilopectina.....	15
Figura 2 - Esquema energia de ativação da reação catalisada ou não com enzima.....	39
Figura 3 - Classificação das enzimas de interesse para este trabalho, segundo IUBMB.....	41
Figura 4 - Esquema simplificado da quebra enzimática do amido.....	48

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
2.1	Vitreosidade, dureza ou textura do endosperma.....	14
2.2	Zeína, a prolamina .....	17
2.3	Processamento do milho e digestibilidade.....	21
2.3.1	Tamanho de partícula do grão de milho moído .....	24
2.3.2	Ensilagem do grão de milho .....	26
2.4	Enzimas exógenas na alimentação de ruminantes .....	36
2.4.1	Amilase.....	41
2.4.2	Proteases .....	48
	ARTIGO .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

O grão de milho reidratado e ensilado (MRE) é um produto da adição homogênea de água ao milho com grão seco e moído, com o objetivo de obter uma umidade acima de 30 % na ensilagem (BITENCOURT, 2012). Comparado à estocagem tradicional, silagem de grão úmido (SGU), MRE tem a vantagem de permitir maior janela de colheita ou a compra estratégica do grão seco.

Comparado ao grão seco moído, o MRE pode concentrar a prática da moagem dos grãos, requerendo menor investimento em equipamentos e instalações para estocagem do grão e pode reduzir os custos de transporte e estocagem em silos graneleiros.

O MRE também permite o cultivo de híbridos farináceos em regiões onde os danos ao milho macio durante a colheita, secagem e estocagem são significativos. Reidratação e ensilagem do milho duro seco aumentam proporcionalmente a digestibilidade do grão mais do que a ensilagem do milho macio (ANDRADE FILHO et al., 2010a).

Quando a SGU de milho duro ou macio foi oferecida às vacas leiteiras, a taxa de produção de leite, por alimento consumido, e a ingestão de matéria orgânica digestível aumentaram com milho macio, sugerindo que a ensilagem não compensou completamente o impacto negativo do grão duro sobre a digestibilidade (COSTA et al., 2014).

A eficiência da ensilagem como uma estratégia para manipulação da digestibilidade do milho pode ser dependente do tamanho de partícula do alimento e da duração de estocagem no silo. Partículas de maior tamanho aumentam a taxa de moagem e reduzem o gasto de energia por unidade de milho, mas a moagem grosseira do grão reduz a digestibilidade do amido no trato total e aumenta a concentração fecal de amido em vacas de leite (FREDIN et al., 2015). Contudo, o impacto negativo da moagem grosseira do grão sobre a

digestibilidade do amido pode ser compensado pelo aumento na degradação da prolamina em silagens estocadas por um período maior (FERRARETTO et al., 2014; KUNG; WINDLE; WALKER, 2014), especialmente para híbridos duros.

O uso de enzimas na ensilagem pode ser uma estratégia para manipular a digestibilidade do amido. Proteases exógenas na silagem podem favorecer a quebra das prolaminas no endosperma do milho. A adição de proteases na ensilagem aumentou a digestibilidade *in vitro* da SGU (KUNG; WINDLE; WALKER, 2014), do MRE (FERRARETTO et al., 2015), e da silagem de milho de planta inteira (YOUNG et al., 2012). A quebra das moléculas do amido pelas amilases e do pericarpo do grão pelas enzimas fibrolíticas pode ser outra estratégia plausível para melhorar a digestibilidade do grão de milho ensilado, apesar de não ter sido ainda avaliada. A ação das enzimas depende do pH e da temperatura para uma taxa máxima de reação (MOTTA, 2011).

Apesar das características da silagem não serem sempre ideais para uma dada enzima, a estocagem do milho por um período maior no silo pode permitir uma ação adequada da enzima, mesmo com taxa reduzida de reação. A mistura de enzimas pode também ter um efeito distinto sobre a digestibilidade do milho comparada à adição de enzima sozinha.

Uma série de experimentos foi delineada para explorar a efetividade de amilase associada ou não com enzimas proteolítica e fibrolítica, como ferramenta para melhorar a digestibilidade ruminal de milho grão reidratado e ensilado. A ensilagem do milho duro e macio foi avaliada como ferramenta para melhorar a digestibilidade do amido pela degradação da prolamina. Os efeitos da duração de estocagem e tamanho de partícula também foram testados. O objetivo foi explorar o uso de enzimas como aditivo para silagem de MRE.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Vitreosidade, dureza ou textura do endosperma

O milho é a principal fonte de amido para alimentação animal no mundo. O grão de milho é composto por cerca de 72% de amido, 9,5% de proteína, 9% de fibra e 4% de óleo (PAES, 2006). Existem dois tipos de cadeia de amido: amilose (cadeia linear) e amilopectina (cadeia ramificada, Figura 1).

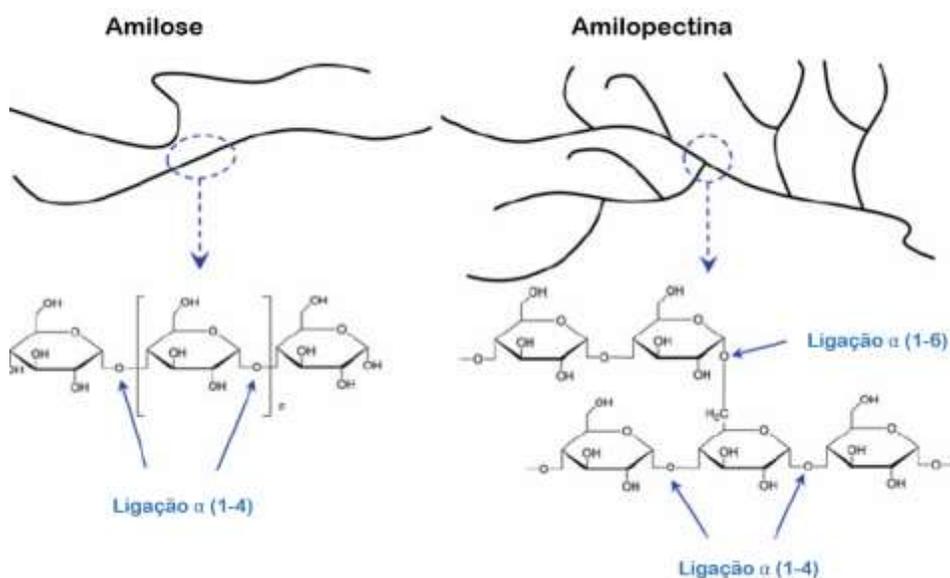
A proporção entre os tipos de amido no endosperma de cereais é determinada principalmente pelo tipo da planta. Cadeias de amido, longas e lineares (amilose), contêm em média 600 unidades de  $\alpha$ -D glicose, unidas por ligações  $\alpha$ -1,4 glicosídicas.

A amilopectina é composta por cadeias grandes e ramificadas de glicose em conformação de alfa-hélice, com unidades de glicose  $\alpha$ -1,4 ligadas, acrescidas de ramificações, unidas por ligação  $\alpha$ -1,6. Pontes de hidrogênio fazem a ligação entre as moléculas formando o grânulo. Os grânulos, por sua vez são formados pela deposição de anéis de crescimento em camadas alternadas de regiões amorfas e cristalinas, essas são unidas por cadeias proteicas. Os grânulos de amido são mantidos unidos por uma rede proteica. As prolaminas fazem a interação entre grânulos, a intensidade dessa interação determina a densidade do endosperma e também a degradação do amido.

Na alimentação de ruminantes, a digestibilidade ruminal do amido varia de 50 a 90% entre híbridos de milho (MOHARRERY; LARSEN; WEISBJERG, 2014). O amido que escapa do rúmen é digerido no intestino delgado e absorvido como glicose ou metabolizado anaerobicamente no intestino grosso a ácidos graxos voláteis (AGV). Fermentar amido no intestino grosso é supostamente indesejável, já que a proteína microbiana produzida a partir da fermentação é perdida nas fezes.

Um mecanismo peculiar em ruminantes é a inibição da secreção de amilase pancreática quando um fluxo grande de amido passa para o intestino delgado (HARMON; YAMKA; ELAM, 2004). Dessa forma, metabolizar amido no rúmen seria a rota preferencial para uso mais eficiente desse substrato, apesar da possibilidade de ocorrência de acúmulo de AGV no fluído ruminal, induzindo baixo pH (acidose ruminal). A capacidade de digestão do amido no intestino delgado de ruminantes varia de 40 a 85% do que chega ao órgão, enquanto a digestibilidade no trato digestivo total pode ser próxima de 100% do amido consumido (HUNTINGTON; HARMON; RICHARDS, 2006).

Figura 1 - Estrutura química da amilose e amilopectina.



A vitreosidade mensura a proporção (%) de endosperma vítreo no endosperma total da semente, sendo uma forma objetiva de mensurar a dureza ou textura do endosperma de cereais, uma característica física do grão. Grãos de milho de textura dura, também chamados de “*flint*” ou vítreos, têm alta

vitreosidade do endosperma, como consequência do alto conteúdo de prolaminas (zeínas) (HOFFMAN; SHAVER, 2016), sendo, portanto, mais resistentes à quebra mecânica durante a colheita, secagem, transporte e armazenamento e também, menos propensos à colonização por fungos (KAMRA, 2005), características desejáveis agronomicamente. Em contrapartida, grãos de textura macia ou farinácea têm maior propensão à quebra mecânica, o que é desejável na ensilagem ou durante a moagem industrial, além de serem mais digestíveis no rúmen e no intestino do que os grãos de textura dura (GIUBERTI et al., 2013).

É importante frisar que a classificação da textura do milho pelo escore de endentação da semente, prática corriqueira na indústria de sementes de milho, não descreve de forma correta a dureza do endosperma (DAVIDE; RAMALHO, 2011). Existe milho duro que é dentado e também existe milho com topo da semente arredondado que é farináceo. Por isso, o termo milho dentado (ou “*Dent*”), supostamente sinônimo de milho macio ou farináceo, deve ser evitado quando se avalia a dureza de grãos de milho. A densidade do grão tem correlação positiva, alta, com a vitreosidade do endosperma (CORREA et al., 2002) e também com o teor de prolamina na semente (HOLDING, 2014), duas medidas indiretas da densidade do milho.

Mensurar a vitreosidade indiretamente é vantajoso, pois além da técnica de dissecação do grão ser manual e trabalhosa, demanda tempo (CORREA et al., 2002; DOMBRINK-KURTZMAN; BIETZ, 1993). Medidas indiretas, como o teor de prolamina, podem ser mensuradas no grão processado ou ensilado, não requerendo grãos intactos, como a vitreosidade e a densidade.

A influência do tipo de endosperma ao ataque enzimático é passível de ser acompanhada por microscopia eletrônica de varredura. Um amido muito denso (de alta vitreosidade e alto teor de prolamina), um normal, e um de milho opaco (endosperma farináceo e com alto teor de lisina), foram expostos à ação enzimática *in vitro* e depois fotografados em microscopia eletrônica

(PLANCHOT et al., 1995). Na superfície do grão de alta vitreosidade apenas ranhuras foram observadas. O amido normal teve sua superfície perfurada, enquanto o farináceo teve sua estrutura completamente quebrada.

Philippeau e Michalet-Doreau (1997), trabalhando com grãos de milho de diferentes híbridos, observaram que a vitreosidade no estágio maduro de maturação foi 72,3% para o híbrido duro e 48,1% para o macio. O milho macio teve maior proporção de fração instantaneamente degradável no rúmen que o milho duro (25,2 vs. 15,7 % do amido). A degradação efetiva no rúmen do milho macio foi 61,3% e a do duro foi 40,1%. A dureza do endosperma pode determinar o tamanho das frações de degradação mais rápida (Fração A) ou mais lenta (Fração B) da semente no rúmen e o potencial de digestão ao longo do trato digestivo de ruminantes (CORONA; OWENS; ZINN, 2006; TAYLOR; ALLEN, 2005).

## **2.2 Zeína, a prolamina do milho**

Entre as proteínas do endosperma de cereais, as prolaminas são aquelas que se encontram associadas aos grânulos de amido, formando uma matriz amido-proteica, representando de 44 a 79% da proteína no endosperma (LANDRY; DELHAYE; DAMERVAL, 2004).

A prolamina do milho é chamada zeína, enquanto as prolaminas do sorgo e do trigo são a kafirina e a gliadina, respectivamente. Prolaminas são ricas nos aminoácidos prolina e glutamina. A prolina é a responsável pela característica hidrofóbica das prolaminas, tornando-a não solúvel em água e formando uma barreira hidrofóbica que envolve os grânulos de amido. O teor de prolamina na semente aumenta com a maturidade da planta e é maior em híbridos com endosperma de alta vitreosidade (HOLDING, 2014).

O endosperma é fonte de nutriente para a germinação da semente. A quebra da proteína na semente é feita por endoproteases, que degradam peptídeos e disponibilizam aminoácidos para o crescimento do embrião. A busca do isolamento, caracterização e identificação das proteases naturais capazes de quebrar a prolamina é de longos anos. Muitos estudos laboratoriais foram realizados e alguns pontos já foram elucidados. Duas endoproteases, da família papaína, denominadas cisteínicas, foram relacionadas à quebra da prolamina. Uma das características dessas cisteínas é a ação em pH baixo (4 a 5,5), fato incomum à família, sinalizando uma provável adaptação ao meio. Os autores sugerem que a acidificação do endosperma do milho provavelmente acontece para tornar as prolaminas mais susceptíveis à clivagem (SIMPSON, 2001).

A composição proteica da zeína varia em peso, solubilidade e localização no endosperma e são divididas em subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ . A  $\alpha$  zeína é a mais abundante representando 70% do total. Zeínas são responsáveis pelo arranjo dos grânulos de amido no endosperma. As subunidades  $\alpha$  e  $\delta$  circulam o grânulo, enquanto as  $\beta$  e  $\gamma$  fazem a junção entre os grânulos de amido (BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000). Na ensilagem do milho, as zeínas são degradadas por enzimas de micro-organismos e da planta, mas não são atacadas proporcionalmente. As subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$  são degradadas de 10 a 40%, já a  $\gamma$  sofre redução de 60% na concentração (HOFFMAN et al., 2011).

A vitreosidade do milho interfere negativamente na digestibilidade do amido em monogástricos. Em um trabalho na área de suínos, Giuberti et al. (2013) classificaram híbridos de milho pela vitreosidade do endosperma em menor que 31% (muito baixa vitreosidade), de 31 a 40% (baixa vitreosidade); de 41 a 49% (vitreosidade média), de 50 a 68% (vitreosidade alta) e maior que 68% (vitreosidade muito alta).

Trinta híbridos foram distribuídos nas 5 classes. Híbridos mais duros resultaram em mesmo tamanho de partícula que os macios. Apesar de a moagem

ter sido feita em mesmo moinho e peneira, os autores não relatam o tempo de moagem, o que pode ter interferido para o tamanho final de partícula. O teor de proteína bruta na semente teve correlação positiva e linear com a vitreosidade do grão. Os autores realizaram incubação *in vitro* simulando digestão gástrica e pancreática e os parâmetros foram calculados como proposto por Giuberti, Gallo e Masoero (2012). O tamanho da fração rapidamente degradável, a fração potencialmente digestível e a velocidade de degradação, calculados para a degradabilidade enzimática *in vitro*, tiveram correlação linear negativa com a vitreosidade.

A degradabilidade potencial entre os híbridos apresentou diferença de 9 unidades percentuais ( $P < 0.05$ ). A taxa fracional de degradação do amido foi de 0,018/h na classe de vitreosidade muito baixa e 0,006 para muito alta vitreosidade, uma queda de três vezes com a maior vitreosidade do grão. Curiosamente, o teor de prolamina (zeína) mensurada pela técnica de Larson e Hoffman (2008) modificada por Giuberti, Gallo e Masoero (2012) não foi correlacionado à vitreosidade do grão neste experimento. O teor de zeína nas classes foi 33, 34, 34, 38 e 47% da MS, do menos vítreo ao mais vítreo, respectivamente ( $P > 0,10$ ). Os autores listam alguns experimentos que encontraram relação similar como Giuberti, Gallo e Masoero (2012), Landry, Delhay e Damerval (2004) e Masoero et al. (2011) e sugerem o fato que apenas uma subunidade de zeína está relacionada com a vitreosidade e não a concentração de todas no milho.

Esse desacordo biológico entre teor de prolamina e digestibilidade é recorrente nos trabalhos. Muitas das pesquisas não relatam os valores de prolamina por não conflitarem com o aumento da degradabilidade. Hoffman et al. (2011) detectaram a degradação das subunidades de prolamina durante a ensilagem, em análise de HPLC, mas ao quantificarem a prolamina no método de turbidez rápido (rTM) não encontraram variação na concentração.

Hoffman et al. (2012) também não puderam relacionar o teor de prolamina com o aumento da fermentação na técnica de produção de gás. As técnicas de quantificação de prolamina foram recentemente modificadas. Nos últimos 20 anos 6 técnicas, novas ou modificadas, foram propostas. Larson e Hoffman (2008) propuseram o método rTM, baseado na utilização de acetona pura, filtragem e secagem, para isolamento da matéria seca não solúvel em acetona. Insolúvel em acetona, a prolamina é solubilizada em álcool isopropílico e mercapto-etanol e detectada por turbidez. A quantificação é feita por curva da dosagem de zeína purificada. Giuberti, Gallo e Masoero (2011), baseados em Larson e Hoffman (2008), propuseram algumas mudanças para aumentar a sensibilidade de quantificação de prolamina.

Em seguida, Giuberti, Gallo e Masoero (2012) propuseram melhorias na técnica de Landry, Delhay e Damerval, (2002) utilizando o terc-butanol para solubilizar a prolamina. Os valores de prolamina dessa nova técnica coincidiram com a técnica de Larson e Hoffman (2008), mas foram menores que as de Hamaker et al. (1995).

Nellis, Hoffman e Shaver (2013) levantam algumas hipóteses sobre o problema da técnica de Larson e Hoffman (2008), como a possível interferência de compostos da quebra da prolamina pela fermentação no silo interferir na leitura. A técnica de Nellis, Hoffman e Shaver (2013) é adotada atualmente. Na avaliação da técnica comparando com a técnica de Larson e Hoffman (2008), a variação da média das leituras foi de uma unidade, com valores de 4,19 para a técnica rTM e 3,24 % da MS, para a nova técnica ( $P < 0,01$ ), reafirmando a superestimava da prolamina pela técnica de Larson e Hoffman (2008).

Nos trabalhos de Kung, Windle e Walker (2014) utilizando a técnica de Nellis, Hoffman e Shaver (2013) o aumento da digestibilidade foi coerente com a redução da concentração de prolamina. Contudo, o trabalho de Ferraretto et al.

(2015), apesar de utilizar a concentração de zeína na discussão, relata apenas o teor de prolamina do milho ensilado.

### **2.3 Processamento do milho e digestibilidade**

Para aumentar a digestibilidade do milho nos diversos segmentos do trato digestivo e o aporte de energia oriunda de amido ao ruminante, alguns processamentos do grão são adotados pela indústria da nutrição animal. Em dois estudos com gado de corte, Harrelson et al. (2009) avaliaram cinco híbridos de milho que foram ofertados para 475 garrotes, na forma de milho maduro esmagado ou como silagem de grão úmido.

A inclusão de milho resultou em dietas com dieta alta em amido, com 67,5% de amido na matéria seca (MS). Animais alimentados com milho moído apresentaram maior ingestão de MS, sem, contudo aumentar o ganho de peso diário. Para nenhuma variável houve interação entre o tipo de híbrido e o processamento. O processamento do milho resultou em maior digestibilidade ruminal da MS, do amido e do trato digestível total maior para o milho como silagem de grão reidratado ( $P < 0,01$ ). A eficiência de ganho de peso pelo consumo foi superior no grão úmido 0,162 vs. 0,154 para o milho esmagado ( $P < 0,01$ ).

O segundo experimento foi direcionado ao estudo da digestibilidade, com uso de duas vacas canuladas no rúmen e no duodeno. Não foi detectada interação entre híbrido e processamento sobre a digestibilidade pós-ruminal dos grãos. A degradabilidade ruminal da MS foi 37,9% no milho esmagado e 68,0% no grão úmido ensilado. A dispersão entre os híbridos avaliados na degradabilidade ruminal do amido foi de 35,5% da MS para milho seco a 76,1% para grão úmido ensilado. Algumas correlações foram feitas pelos autores, a

dureza do grão foi correlacionada positivamente ao tempo de moagem, com aumento do tempo de moagem com o milho mais duro.

No trabalho de Bitencourt (2012) três processamentos para milho foram testados e inclusos em dieta com 27% de amido. O mesmo híbrido foi fornecido a 15 vacas em delineamento do tipo quadrado latino, com tratamentos, milho maduro finamente moído, silagem de milho maduro finamente moído (3 mm) e reidratado e milho extrusado. O período de ensilagem, compreendido entre o fechamento do silo e a abertura realizada no primeiro dia do experimento, foi de 327 dias. O teor dietético de silagem de milho reidratado foi 16,7%, de milho moído foi 17,4% e de milho extrusado foi 17,7% da MS. A produção média de leite foi 33,3 kg/d, não variando significativamente entre tratamentos. O milho extrusado deprimiu a secreção de energia e de gordura no leite e a ingestão de matéria seca e tendeu a aumentar o teor de proteína do leite. Houve tendência de aumento na digestibilidade da matéria orgânica no tratamento com silagem de milho reidratado.

A síntese relativa de proteína microbiana no rúmen foi maior e o teor de nitrogênio ureico no leite foi menor no tratamento com milho reidratado, sugerindo que a degradação ruminal do amido foi mais sincrônica à degradação da proteína dietética nesse tratamento. A ensilagem do grão aparentemente aumentou a proporção do amido dietético digerido no rúmen, comparativamente ao grão finamente moído, sem afetar a digestibilidade do amido no trato digestivo total. Tanto a extrusão quanto a ensilagem tenderam a aumentar a relação entre a produção de leite e o consumo, resposta típica ao processamento de grãos em dietas para ruminantes.

A proporção da partição da digestão do amido entre rúmen e intestino pode ser manipulada pelo processamento do milho. A proporção da digestão do amido no rúmen aumentou em 20% quando milho foi ofertado na forma de silagem de grão úmido comparado com o milho moído (OWENS, 2016).

Contudo, o aumento na digestão ruminal do amido não aumenta a digestibilidade do amido no trato digestivo total na mesma proporção. Os 20% de aumento na digestão ruminal do amido induziu ganho de 8% na digestibilidade do amido no trato digestivo total, enfatizando a capacidade intestinal de digerir amido.

Em uma compilação de dados oriundos de coleta total de fezes de 238 vacas em lactação ao longo de 6 experimentos conduzidos no Brasil (milho com textura dura do endosperma) sob a mesma metodologia no mesmo centro de pesquisa, a digestibilidade do amido no trato digestivo total foi  $95,3 \pm 2,57\%$  do amido consumido (86,2 a 99,5%). O banco de dados era composto por vacas Holandesas com produção de  $31,5 \pm 5,8$  kg/d, consumindo  $20,9 \pm 2,9$  kg de MS/d de dietas com  $29,0 \pm 2,7$  % de amido na MS (PEREIRA; BARBOSA; PEREIRA, 2015).

Nozière et al. (2014) avaliaram a partição da digestão do amido em vacas leiteiras (24,4 kg de leite/d e 18,9 kg de consumo de MS), consumindo dietas com 20 ou 30% de amido na MS, e suplementadas ou não com amilase exógena. A digestibilidade do amido no trato digestivo total variou de 87,6 a 99,2% do amido consumido, a digestibilidade no rúmen variou de 73,9 a 82% do amido entrando no órgão, e a digestibilidade pós-ruminal variou de 86,7 a 95,8% do amido chegando aos intestinos.

A proporção da digestão do amido que ocorreu por fermentação ruminal variou de 75 a 84%, enquanto a proporção que ocorreu por digestão enzimática e microbiana nos intestinos variou de 16 a 25%. As dietas com 20% de amido tiveram digestibilidade ruminal do amido similar às dietas com 30% de amido, mas nas dietas de baixo amido a digestibilidade pós-ruminal do amido foi menor que nas dietas de alto amido. Isso sugere que o metabolismo microbiano no rúmen utilizou uma maior proporção de amido potencialmente digestível da dieta quando a dieta dispunha de um menor aporte de amido no rúmen. O uso de amilase aumentou a digestibilidade do amido no rúmen, e houve ganho na

digestibilidade pós-ruminal quando a enzima foi acrescida à dieta de amido alto e queda quando foi acrescida à dieta de amido baixo.

A suplementação com amilase exógena aumentou a proporção do amido sendo digerido no rúmen, demonstrando que estratégias capazes de atuar sobre a digestibilidade ruminal do amido são capazes de manipular a partição da digestão do amido ao longo do trato digestivo de vacas leiteiras.

### **2.3.1 Tamanho de partícula do grão de milho moído**

Entre os processamentos que visam aumentar a digestibilidade do amido do milho, a moagem é muito usada mundialmente. Além de ser relativamente barata comparada com outros processos térmicos, moinhos são de fácil manejo e instalação nas fazendas. Assume-se que o tamanho ótimo de partícula do milho para maior digestibilidade é o mais fino possível (HOFFMAN; SHAVER, 2016).

Muitas vezes, a opção por moagem mais grosseira ocorre devido ao baixo rendimento em kg/h e alto gasto de energia elétrica para moagem mais fina. O rendimento médio de moagem, estudando cinco máquinas, foi 140 kg/h com a peneira com crivo de 1 mm e 600 kg/h com o crivo de 3 mm (RODRIGUES et al., 2000). Ter rendimento de moagem compatível à demanda da fábrica é alto determinante da eficiência na indústria de rações. No caso de milho grão para ensilagem (grão úmido ou maduro reidratado), moagem fina é incompatível com alguns equipamentos de colheita e processamento dos grãos entre a lavoura e os silos, principalmente em grandes fazendas, que exigem alto rendimento de moagem. Moagem fina também não é plausível para grãos com alta umidade.

De acordo com o informe do California Pellet Mill (2016), alguns fatores da máquina interferem no tamanho de partícula final do produto moído.

Condições dos martelos e telas ou condições das ondulações em caso de moinho de rolo interferem no resultado. Tanto moinho de rolo como de martelo são usados industrialmente no processamento de grãos, contudo o moinho de martelo é mais direcionado objetivando partículas menores. Apesar de fácil operação e baixo custo de manutenção, o alto custo de energia elétrica tem levado a cogitar a eficiência do moinho de martelo. O sistema de rolo processa de 15 a 40% mais grãos por hora que o outro. Apesar do tamanho médio de partícula final ser similar para os dois processadores, a distribuição do tamanho de partícula resultante tem menor variação com relação à média no moinho tipo rolo.

Características do grão, como textura do endosperma e teor de umidade interferem no tamanho de partícula final na moagem. Rausch et al. (2005) descreveram a distribuição do tamanho de partícula de cinco híbridos de milho que, de acordo com o cultivar, era de textura macia. Todos os híbridos foram moídos em moinho com peneira de crivo de 3,2 mm. O diâmetro médio de partícula não diferiu entre híbridos ( $9,4 \pm 0,036 \mu\text{m}$  em média). Entretanto, a distribuição das partículas acima dos crivos avaliados variou entre híbridos. Ao analisar as amostras em peneiras granulométricas, 56,5% do material ficou retido acima da peneira de  $8.400 \mu\text{m}$  (média de todos os híbridos). A variação da quantidade retida em cada peneira foi de até 62,5% entre os híbridos. Assim, como houve variação no tamanho de partícula para o mesmo híbrido, ao comparar híbridos de dureza diferente é esperado que diferença seja aumentada.

Rémond et al. (2004) estudaram o efeito do tamanho de partícula do grão de milho sobre a digestibilidade do amido de milho duro e macio em vacas em lactação. Dois experimentos foram realizados, o primeiro com híbrido semifarináceo foi moído em peneira de crivo de 3 mm e posteriormente dividido em 3 granulometrias por separação em peneiras. O tamanho de partícula médio de cada fração foi 730, 1.807 e  $3.668 \mu\text{m}$ , foi adicionado à dieta com inclusão de

36,4% da matéria seca compondo os três tratamentos. Para tanto, seis vacas em lactação, com cânula ruminal, duodenal e ileal, foram alimentadas em experimento de delineamento quadrado latino 3 x 3.

O tamanho de partícula não interferiu no consumo, mas partículas menores tiveram maior digestibilidade ruminal e intestinal. A digestibilidade do amido no trato digestivo total foi de 91,4% para partículas de 730  $\mu\text{m}$ , 86% para partículas de 1.807  $\mu\text{m}$  e 69,5% para partículas de 3.668  $\mu\text{m}$ . Esse melhor aproveitamento da energia resultou em tendência a maior produção de leite que de acordo com os tratamentos foram 19,8 no tratamento de 730  $\mu\text{m}$ , 18,3 para 1.807  $\mu\text{m}$  e 18,2 kg/d para a granulometria de 3.668 ( $P = 0,06$ ).

Em um segundo experimento, estes autores avaliaram milho híbrido tipo farináceo, processado para obter granulometrias de 568 e 3458  $\mu\text{m}$ , inclusos na mesma proporção de 36,4% da MS da dieta. Novamente o consumo de MS não foi afetado pelo tamanho de partícula. Para esses híbridos farináceos, a digestibilidade do amido no trato digestivo total foi de 89,2% para 3.458  $\mu\text{m}$  e 97,3% para 568  $\mu\text{m}$ . Neste caso, o tamanho de partícula não afetou a digestibilidade intestinal do amido. Esses dados sugerem que obter fina (3 mm) granulometria de moagem pode ser mais importante na determinação da digestibilidade ruminal e intestinal do amido em milho de endosperma duro.

### **2.3.2 Ensilagem do grão de milho**

A ensilagem é um processo antigo de armazenagem de alimentos cujo princípio é a acidificação, e em larga escala é compatível com a demanda de fazendas leiteiras (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Além de conservar nutrientes do alimento por um processo biológico que gera perdas relativamente baixas, durante a ensilagem ocorre proteólise de prolaminas do

endosperma do milho, tornando o alimento mais digestível pelo ruminante (HERON; EDWARDS; MCDONALD, 1986; HOFFMAN; SHAVER, 2016).

O aumento da concentração de nitrogênio amoniacal e de proteína solúvel durante a ensilagem tem correlação positiva com a degradação de prolaminas do endosperma em silagem de milho grão, sendo essas, medidas indiretas da degradação proteica no silo (HOFFMAN et al., 2011).

A colheita e ensilagem de milho grão úmido, idealmente com 60 a 65% de umidade no grão (estágio de maturação de linha negra), é uma prática comum na cadeia leiteira mundial e com extensa pesquisa publicada (FERRARETTO et al., 2014; HOFFMAN et al., 2011; OBA; ALLEN, 2003; SCHAEFER et al., 1989). Com a vantagem de menor fração vítrea devido à colheita precoce e facilidade de maquinário para processamento, a silagem de grão úmido é uma opção para armazenamento e conservação do milho na fazenda e para o encurtamento do período de ocupação do solo pela lavoura de milho. A colheita para o milho grão úmido acontece 21 dias antes da colheita do milho grão maduro.

Oba e Allen (2003) compararam a silagem de grão úmido ao milho moído fornecidos a vacas em lactação em duas inclusões de amido, 32 ou 21% da MS da dieta. A taxa de digestibilidade ruminal do amido foi influenciada pela conservação do milho e concentração do amido na dieta. Com valores em %/h de 28,2 para alto amido grão úmido, 14,6 alto amido milho moído, 16,8 baixo amido com grão úmido e 12,2 para baixo amido com milho moído, a maior ingestão de amido somada a maior digestibilidade ruminal, poderia resultar em acidificação ruminal.

Contudo, o pH ruminal máximo, médio e mínimo diário e o tempo de pH abaixo de 6, 5,8 e 5,5 foram alterados pela inclusão de amido na dieta, mas não pelo processamento do milho. Ou seja, a maior inclusão de amido somada à maior digestibilidade não prejudicou o ambiente ruminal. Infelizmente a

produção e composição do leite não foram relatadas no trabalho para um estudo mais criterioso. Avaliando o fluxo de nitrogênio, os autores concluíram que a inclusão mais baixa de amido na dieta (21 %) limitou a produção de nitrogênio microbiano. Assim, o aumento da digestibilidade proporcionada pela ensilagem do milho, foi benéfico especialmente por não causar acidificação ruminal.

O armazenamento do milho por ensilagem do grão maduro reidratado é uma tecnologia de abordagem antiga (MCLAREN; MATSUSHIMA, 1968), mas com adoção crescente no Brasil (PEREIRA et al., 2013). O grão maduro (10 a 14 % de umidade) é moído e reidratado para obter teor de umidade acima de 30% da matéria natural e depois ensilado (ANDRADE FILHO et al., 2010a). O MRE tem como vantagens poder adquirir o milho sem precisar ser cultivado na fazenda, liberando área para plantio de outra cultura, além disso, pode ser adquirido durante a safra, quando o preço é mais acessível.

Quando o produtor opta pelo cultivo, a colheita tem uma janela maior e não coincide com a ensilagem de planta inteira, por exemplo, favorecendo o aluguel de maquinário. Essa forma de armazenamento protege o milho contra o ataque comum de pragas ao milho grão. Uma vez ensilado, o milho grão sofre proteólise por enzimas microbianas e da planta melhorando sua qualidade nutricional (HERON; EDWARDS; MCDONALD, 1986; HOFFMAN et al., 2011).

O ganho em digestibilidade do amido pela ensilagem após hidratação do milho grão foi constatada por Ferraretto, Fredin e Shaver (2015). No experimento, o milho foi reidratado até 70% da MS e armazenado em sacos a vácuo por 30 dias. O pH do milho reduziu de 6,72 para 4,40 no silo ( $P < 0,01$ ) mostrando que houve fermentação. O teor de proteína solúvel aumentou de 18,0 para 22,5% da PB ( $P < 0,01$ ), sugerindo a quebra da prolamina, que foi confirmada pelo aumento da digestibilidade *in vitro* do amido de 52,6 para 64,9% do amido ( $P < 0,01$ ).

O MRE foi testado na nutrição de 12 vacas em lactação com produção média de leite de 35 L/d (MENDES, 2013). Os tratamentos foram milho seco ou MRE inclusos na dieta na proporção de 4,5% da MS. O milho para os dois tratamentos foi moído a 2 mm e no caso da silagem, foi reidratado (35% de umidade) e ensilado por 60 dias. O milho reidratado deprimiu consumo de MS de 20,7 para 19,1 kg/d, sem afetar, contudo a produção de leite (34,97 kg/d em média), induzindo aumento de 1,7 para 1,8 na relação entre o leite produzido e o consumo de MS ( $P < 0,05$ ). O ganho em eficiência alimentar em resposta ao processamento do amido foi similar ao observado por Bitencourt (2012), também com vacas leiteiras e silagem de grão reidratado.

Tipo de endosperma do híbrido ensilado interfere na digestibilidade da silagem final. O maior teor de prolamina relacionado ao milho vítreo, mesmo após a ensilagem, reduz a degradabilidade *in vitro* do milho (HOFFMAN et al., 2011). Milhos com texturas diferentes de endosperma, macio (49,6 % vitreosidade) e duro (79,7 % vitreosidade), foram moídos por peneira de 5 mm, hidratados (30 % de umidade) e ensilados em silos experimentais. Relacionando à vitreosidade, o teor de proteína do milho, o híbrido duro apresentou maior PB 10,58 vs. 9,75 % da MS para o milho macio ( $P < 0,01$ ).

O teor de N-NH<sub>3</sub> na silagem também foi maior no híbrido duro 0,67 vs. 0,45 ( $P < 0,01$ ). No ensaio de degradabilidade *in vitro*, o milho original não ensilado, dos dois híbridos e amostra de silagem foram incubados para averiguar o ganho com a ensilagem. A fração A foi maior para as duas silagens, maior para o milho macio 54,3 vs. 48,5% do incubado. O efeito da ensilagem sobre esta variável foi mais intensa sobre o híbrido duro, pois o aumento da fração A, com relação ao milho não ensilado foi de 25,9 unidades percentuais, enquanto o milho macio aumentou 21 unidades percentuais comparado ao milho não ensilado. O resíduo de incubação de 72 h para as silagens foi de 1,5 para o milho macio, 2,3% da MS para o milho duro e para o milho não ensilado os valores

foram 2,6 para o híbrido macio e 5,2 % da MS para o híbrido duro ( $P < 0,01$ ). A ensilagem melhora a degradação dos dois tipos de endosperma, mas o maior ganho é para o milho de endosperma vítreo (ANDRADE FILHO et al., 2010a).

Fernandes (2014) realizou um estudo da interação do híbrido, ponto de maturação e o tempo de ensilagem. Dois híbridos, um macio (59,15% de vitreosidade) e outro duro (79,20% de vitreosidade) foram colhidos em três pontos de maturação. Primeiro em ponto de silagem planta inteira, o milho foi manualmente debulhado (30 a 35 % de MS). No ponto de linha preta para ensilar como grão úmido (grão com 28 a 33% de MS) e uma terceira parte foi colhida seca (grão com 15 a 20% de MS). Todos os grãos foram triturados em peneira de 12 mm e ensilado em silos experimentais.

O milho seco foi reidratado antes de ensilar até o valor de 30 a 33,5% de umidade. Os silos foram abertos nos tempos 0, 7, 21, 60 e 120 dias. No momento da ensilagem, o híbrido farináceo no ponto de grão úmido apresentava vitreosidade com valor de 57,82 que aumentou para 59,15% no ponto máximo de maturação. Enquanto o híbrido duro apresentou vitreosidade com valor próximo ao dentado no ponto de grão úmido 58,11, aumentou para 79,20%. O teor de amido no momento da ensilagem não diferiu entre híbridos, mas foi maior na silagem de grão úmido, 68,81 enquanto a planta inteira foi de 59,76 e o ponto de grão seco 66,23% da MS média para os dois híbridos.

O teor de proteína e de prolamina aumentaram com a maturação da planta ( $P = 0,02$ ). Diferenciando entre os híbridos, os valores de prolamina para o milho macio foram de 2,47, 3,82 e 4,04 % da MS e para o híbrido duro foram 2,63, 4,96 e 5,14% da MS para o estágio crescente de maturações, respectivamente.

O teor de carboidratos solúveis reduz a menos de 2% da MS com 7 dias, para a silagem no ponto de planta inteira (SPI) e silagem de grão úmido (SGU). Enquanto a redução do teor de carboidrato solúvel na silagem de grão reidratado

(MRE) aconteceu apenas aos 21 dias. Com 120 d de ensilagem os valores de carboidrato solúvel para as três silagens não foram diferentes. O teor de prolamina reduziu nos primeiros 21 dias de ensilagem e permaneceram constantes até 120 d ensilado para SGU e MRE.

Contudo, a SPI não teve a prolamina degradada durante a ensilagem reduzindo apenas 1% da MS entre os dia 60 a 120 dias de ensilagem. Os teores de N amoniacal e proteína solúvel aumentaram constantemente durante a ensilagem para todas as silagens e híbridos ( $P < 0,01$ ). A degradabilidade da MS *in vitro* com 12 horas de incubação aumentou de aproximadamente 50% da MS para próximo de 80% da MS até 60 dias e permaneceu até 120 dias. A redução do pH aconteceu em todas as silagens. O maior teor de ácido lático e acético foi na SPI. A concentração de ácido butírico foi até 2.000 vezes maior no MGR do que nas outras silagens, para os dois híbridos. Os níveis de acetona foram maiores para MRE, aumentando linearmente até 60 dias e tendendo a reduzir com 120 dias. Essa variação foi comum para os dois híbridos, mas com significante menores valores para o híbrido macio, que por sua vez teve concentração maior de acetato de etila. De acordo com o autor esse último é metabólito da fermentação por *Clostridium*, que pode estar ligado à perda de MS da silagem de MRE que atingiu 6% aos 120 dias.

Alguns fatores afetam as características como digestibilidade da silagem de grão de milho, entre eles estão teor de umidade e granulometria da moagem. A adição de água ao milho tem a finalidade de promover ambiente adequado para que a fermentação bacteriana ocorra e a produção de ácido lático controle o crescimento de micro-organismos indesejáveis, da mesma forma que acontece em silagem planta inteira.

O excesso de água leva a perda de nutrientes por lixiviação e retarda a redução do pH, pela diluição do ácido. Pelo contrário, a falta de umidade impede o crescimento de bactérias do ácido lático. Um dos primeiros trabalhos de

hidratação de milho, as duas formas de ensilagem de milho grão foram contrastadas (SGU e MRE), ensiladas em três matérias secas distintas (21,5, 27,5 e 33,1 % de matéria seca) e em duas granulometrias inteiro ou esmagado.

Diferente de outros trabalhos em que o teor de matéria seca é confundido com a maturação da planta, geralmente os diferentes teores de MS são estudados com colheita em pontos de maturação diferentes. Nesse trabalho, os autores colheram na maior umidade e secaram em estufa para atingir a MS esperada. Avaliando os fatores em separado, o milho ensilado inteiro apresentou maior perda de MS 4,6 vs. 3,4% e pH mais alto 5,6 vs. 5,1 ( $P < 0,01$ ). A perda de matéria seca foi crescente com o teor de umidade da silagem. Apesar do maior pH, a silagem de milho reidratado apresentou menor perda de MS (3,5 vs. 4,5 %). No MRE, a concentração de ácidos e o pH também foram crescentes com a hidratação com valores de pH de 5,9 (21,5%), 5,32 (27,5%) e 4,96 (33,1%). Assim a melhor silagem de milho nesse trabalho foi milho esmagado reidratado na umidade de 33,1% (GOODRICH; BYERS; MEISKE, 1975).

Andrade Filho et al. (2010b) também testaram diferentes teores de hidratação para o MRE, 20, 30 ou 40% de umidade. A moagem do milho foi através de peneira de crivo de 5 mm, o milho foi ensilado em silos laboratoriais por 28 dias. O pH da silagem reduziu com o aumento da quantidade de água adicionada ao milho seco, indicando melhora na fermentabilidade. Contudo, o valor não apresentou diferença significativa quando a hidratação aumentou de 30 para 40%. A concentração de nitrogênio amoniacal, outro indicativo de fermentação, aumentou quando o teor de umidade aumentou de 20 para 30% com valores variando de 0,19 para 0,60% do N ( $P < 0,01$ ). Contudo nitrogênio amoniacal pouco alterou na hidratação de 40% com valor de 0,66% do N. Neste trabalho a perda de MS não diferiu entre os tratamentos ( $P > 0,10$ ). Os autores indicaram a reidratação com 30% de umidade para ensilagem.

A porcentagem de hidratação também foi estudada por Rezende et al. (2014). O milho foi moído em peneira de crivo de 4 mm e a hidratação foi de 300 (33% de umidade), 350 (39% de umidade) ou 400 ml (44% de umidade) de água por quilo de milho. Os silos laboratoriais foram feitos em tubos de PVC e ficaram ensilados por 30 dias. O teor de MS aumentou com a ensilagem comparando com a massa ensilada. Os valores do teor de matéria seca ensilada e aos 30 d, para os tratamentos 300, 350 e 400 ml/kg de hidratação, foram 66,62 e 68,24; 60,77 e 62,30 e 56,22 e 57,61% da matéria natural. A concentração de ácido acético, láctico e propiônico acompanharam a mesma tendência da concentração de ácido total com valores de 15,9, 15,4 e 14,8% da MS, para a dose crescente de hidratação, respectivamente ( $P = 0,05$ ). O teor de hidratação determinou o tipo de fermentação, o que resultou em melhor estabilização aeróbia para inclusão de 300 ml/kg de água (32% de umidade). O teor de hidratação não interferiu na perda de MS.

Apesar dos três trabalhos com umidade terem resultado em recomendações semelhantes, por volta de 30% de umidade, a perda de matéria seca foram diferentes nos trabalhos. Em alguns o aumento da perda de MS foi relacionado ao aumento da umidade do material ensilado (GOODRICH; BYERS; MEISKE, 1975) e não variação da perda de matéria seca com variação da umidade na ensilagem (ANDRADE FILHO et al., 2010b). A média de perda de MS relatada na meta-análise com silagem de milho grão úmido foi de 2,8 %.

No silo PVC com saída de gás os valores de perda de MS variam muito, com valores relatados de 1,5% (ANDRADE FILHO et al., 2010a), 4,67% (GOODRICH; BYERS; MEISKE, 1975) e 6,8% (FERNANDES et al., 2016). As perdas na ensilagem ocorrem por lixiviação ou evaporação de água e gases. No caso da silagem em silos *bag*, apesar de não haver saída de gás ou água, ainda assim há perda por respiração ou fermentação (MCDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). Ferraretto, Fredin e Shaver (2015) relatam

perda de MS de 2,3% em silo tipo *bag* de MRE com adição de protease, enquanto Fernandes (2014) relata valores mais altos de 5,8% de perda de MS em silagem de milho reidratado ensilado em silos laboratoriais. A variação desses valores faz questionar a extrapolação dos dados para a realidade.

Contudo a mensuração em silos com dimensão de fazendas, tem suas limitações e impossibilita o controle de outras variáveis como densidade, além de ser difícil a repetibilidade. Ainda assim, a simulação de ensilagem no silo *bag* deve ser revista, pois além da condição de anaerobiose que não existe em silos reais há o aumento de pressão causada por gases gerados da fermentação e que provavelmente altera os demais processos da fermentação.

O perfil fermentativo ao longo do tempo até 330 dias de ensilagem do MRE foi descrito por Arcari et al. (2016). O milho foi moído a 2 mm e hidratado até 33% de umidade e ensilado em silos laboratoriais. Os tempos de abertura foram 3, 30, 90 e 330 dias. A vitreosidade do grão, obtida por dessecação do grão, foi de 67%. A queda do pH ocorreu no 30 d quando o valor reduziu de 5,2 com 3 dias de ensilagem para 3,8 quando permaneceu constante até 330 dias. A ensilagem não alterou a MS ou a PB, mas reduziu o teor de amido gradativamente com variação final de 2,4 pontos percentuais comparando valores dos 3 aos 330 dias ensilado ( $P < 0,01$ ). A concentração de nitrogênio amoniacal aumentou 8 vezes durante a ensilagem, com aumento gradativo até 90 dias quando conservou a concentração final de 8% da PB. Houve aumento dos ácidos láctico, acético, propiônico e butírico ( $P < 0,01$ ). A produção de ácido, de maneira geral, foi crescente até 60 d com pouco ou nenhuma alteração na concentração. A detecção de álcool tem pico com 60 d (0,7% da MS) e permanece quase inalterado ( $P > 0,10$ ). O aumento da degradação do amido *in vitro* em 12 h foi linear aumentando com o tempo de ensilagem. O aumento da digestibilidade é proporcional ao tempo ensilado e estabilização da fermentação ocorre aos 60 dias.

A identificação dos micro-organismos e seus produtos na silagem ajuda a caracterizar o tipo de fermentação e entender as alterações na composição do alimento ensilado e da silagem. Considerando o pH final da silagem de planta inteira (3,8 - 4,0) menor que o pH do MRE (4,5 - 4,8) (YOUNG et al., 2012), provavelmente pelo menor teor de açúcar solúvel, ainda assim, o MRE é fermentado e ácidos oriundos da fermentação foram detectados por Arcari et al. (2016) e Fernandes (2014). Os produtos gerados da fermentação do MRE relatado nos trabalhos foram ácidos láctico, acético, propiônico e butírico, etanol e acetona. A concentração de ácido butírico é indício de fermentação por *Clostridium*, uma bactéria anaeróbia que fermenta ácido láctico resultando em aumento do pH.

Carvalho et al. (2015), ao isolarem DNA presente no MRE com 0, 7 e 120 dias de ensilagem descreveram a diversidade de micro-organismos. A proporção de *Enterococcus* foi de 13,8, 24 e 20,5% respectivamente ao tempo crescente de ensilagem. O *Lactobacillus* foi quantificado na concentração de 9,1 no dia 0, 11,2 no dia 7 e voltou a diminuir no dia 120 com 6,8% dos DNA na silagem. A população de micro-organismo que mais cresceu foi a de *Clostridium* que na ensilagem era de 19,5 reduziu para 12,9% provavelmente pela produção de ácido mas voltou a crescer e na abertura, com 120 dias, a concentração era de 37,7 % das sequências analisadas. O pH alto e a presença de ar favorecem o crescimento de micro-organismos deterioradores da silagem como fungos e leveduras. Nesse trabalho, a forma de ensilagem não foi descrita para correlacionar o tipo de silo e a compactação.

Assim como em silagem de planta inteira as perdas na ensilagem do grão trazem prejuízos, e o uso de inoculante comercial pode ser adotado para reduzir o gasto de açúcar solúvel durante a fermentação com redução rápida do pH na ensilagem e controle do crescimento de micro-organismos. Em silagem de grão úmido, segundo meta-análise de Morais et al. (2016), nenhum dos dois

tipos de inoculantes altera a perda de MS. O inoculante mais comum em silagem de planta inteira, o *L. buchneri*, uma bactéria heterofermentativa, foi testada em um trabalho pesquisando diferentes inoculantes em MRE.

O milho seco moído reidratado foi ensilado em baldes por 90 dias. O pH final da silagem foi mais alto que no controle (4,43 vs. 3,84) e a perda de MS dobrou com relação ao controle (1,22 vs. 0,60 %). Ainda no mesmo trabalho, a inoculação com *L. plantarum* ( $1.0 \times 10^5$  ufc/g de milho) resultou em menor pH e redução da perda de MS em SGU. Contudo, o nitrogênio amoniacal também foi menor ( $P < 0,01$ ) indicando menor quebra de proteína. No terceiro teste, a inoculação foi feita com três cepas de bactérias, *Enterococcus faecium* e *L. plantarum* ( $1,0 \times 10^{10}$  cfu por grama do produto) e *Pediococcus acidilactici* ( $1,0 \times 10^9$  cfu por grama do produto), mas também não alterou os indicadores fermentativos, sem ocorrer efeito em pH ou na perda de MS (MORAIS et al., 2015).

## 2.4 Enzimas exógenas na alimentação de ruminantes

Enzimas são proteínas produzidas pelos organismos vivos que aceleram reações químicas de forma seletiva, reduzindo o tempo da reação em até  $10^{16}$  vezes. As enzimas catalisam a reação reduzindo a energia de ativação, fazendo com que essa ocorra em menor tempo e com menor gasto de energia (Figura 2). Ou seja, são catalizadores biológicos altamente específicos. Possuem especificidade e seletividade com relação às substâncias com que interagem (sistema chave-fechadura). A capacidade de reação é regulada pela quantidade de substrato disponível, concentração de produto formado, além da interação com outros metabólitos do meio.

As enzimas exógenas comercializadas como aditivos para a produção animal são obtidas do filtrado de cultivo de micro-organismos (PLANCHOT et

al., 1995). A separação do meio de cultura do substrato mais a enzima é feita por decantação ou precipitação com sulfato de amônia ou solvente orgânico, como a acetona (GUPTA et al., 2003). Depois de isolada, a solução com enzima é analisada para quantificar a atividade enzimática, ou seja, a quantidade molar da enzima na solução. A atividade enzimática representa a capacidade da enzima de atuar na quebra do substrato e a unidade que será expressa varia de acordo com a técnica utilizada (FREY; HEGEMAN, 2007). O extrato da enzima é adicionado ao substrato e após incubação a tempo determinado, quantifica-se o produto gerado ou a quantidade que restou do substrato.

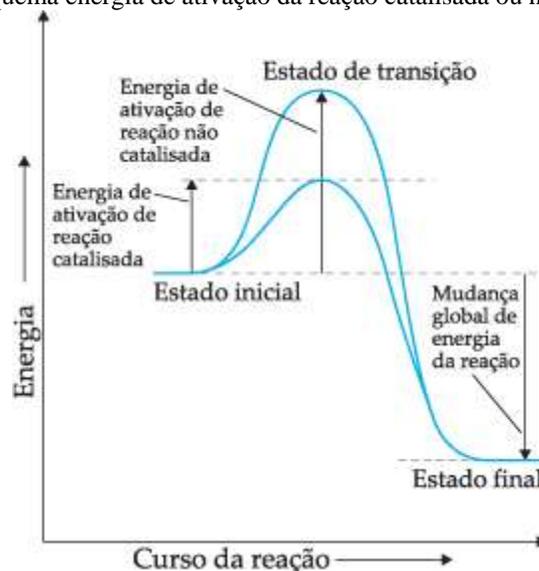
Por convenção, 1 U equivale à quantidade do produto enzimático que catalisa 1  $\mu\text{mol}$  do substrato por minuto. Como um micro-organismo pode produzir mais de uma enzima, o extrato poderá ser testado para cada atividade enzimática. Geralmente o produto comercial terá sua atividade principal quantificada e atividades secundárias apenas relatadas. No caso das amilases, a unidade comumente usada é a KNU (*Kilo Novozymes Units*), que é a quantidade de enzima capaz de degradar 5,26 g de amido por hora ou ainda AGU (*Amyloglucosidase unit*) que é a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de maltose por minuto.

Técnicas aprimoradas usam a unidade FAU (*Fungal alpha-amylase unit*), que é referente a 1 g de amido convertido por hora, baseado em 11-25 min de reação, em solução de pH 5,0 e temperatura de 37 °C. A unidade de CU (*Ceralpha units*) é a quantidade de enzima em presença de excesso de amilase requerida para liberar um micromole de nitrofenol a partir de maltohepatoside em um minuto de reação. A sigla FBG (*Fungal beta-glicanase*) indica a quantidade de enzima que libera uma molécula de glicose por minuto, em pH 5,0 e 30 °C. Para proteases usa-se AU-A, Anson unit, que é a quantidade de enzima que produz 1  $\mu\text{mol}$  de amônia por minuto (ÅKERBERG et al., 2000).

A estrutura dimensional da cadeia de aminoácidos da enzima interfere na ação enzimática. Agentes químicos e físicos na solução podem alterar a conformação estrutural da enzima. Técnicas de inativação são peculiares de cada cadeia enzimática para proteger a conformação molecular. A ação enzimática é inibida por íons metal, reagentes hidratados ou sulfatos e EDTA (GUPTA et al., 2003).

Enzimas possuem em sua cadeia uma fração chamada sítio ativo responsável pela conexão com a cadeia do composto a ser quebrado. Nesse local há grupos químicos ionizáveis que podem ter carga elétrica positiva, negativa ou nula. O pH do meio pode interferir na conformação da cadeia, exigindo um valor próximo ao ótimo para a máxima atividade catalítica. Geralmente, as características do meio para o máximo desempenho da enzima biológica são associadas às características do meio de cultivo do micro-organismo que deu origem à enzima. Por isso, enzimas provindas do cultivo de micro-organismo são distintas na exigência específica de meio, no modo de ação e na afinidade. Por exemplo, uma mesma alfa-amilase pode degradar melhor o amido de batata que amido de trigo ou milho. Da mesma forma, uma alfa-amilase provinda da cultura de diferentes micro-organismos tem habilidade de quebra da cadeia de glicose em locais diferentes, originando diversos produtos finais (PLANCHOT et al., 1995).

Figura 2 - Esquema energia de ativação da reação catalisada ou não com enzima.



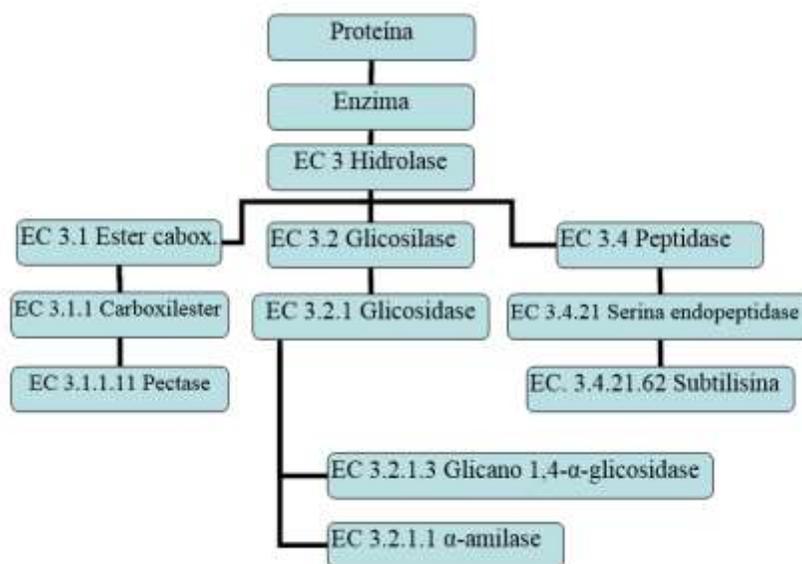
As enzimas são denominadas e classificadas de acordo com a reação que catalisam, tipo de substrato e ponto específico de quebra. A comissão internacional IUBMB (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) atribui a cada enzima uma sequência de quatro números referente à sua nomenclatura oficial (Figura 3). As enzimas são divididas em 6 classes de acordo com a reação química de quebra: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Entre as hidrolases (EC 3) na subclasse 1 (EC 3.1) estão as enzimas que hidrolisam éster carboxílico. As glicosilases, enzimas que quebram cadeias de glicose, estão listadas na subclasse 2 (EC 3.2) e na subclasse 3 (EC 3.3), temos as peptidases, enzimas com ação proteolítica. A subclasse glicosilase é dividida em 3 grupos: glicosidase (hidrolisam compostos O-e S-glicosil), hidrolisadores de compostos

N-glicosil e hidrolisadores de compostos S-glicosil. As enzimas mais utilizadas na indústria são as glicosidases (EC 3.2).

O uso de enzima como promotores de digestibilidade na nutrição de monogástricos é prática de longa data. A suplementação de ruminantes com enzimas exógenas teve início nos anos 60, com o uso de uma mistura de enzimas com atividade amilolítica, proteolítica e celulolítica para gado de corte, que resultou em aumento na eficiência de ganho de peso por consumo de matéria seca de 6 para 21,2% (BURROUGHS et al., 1960). Atualmente, enzimas têm sido avaliadas como forma de quebrar nutrientes ainda presentes na dieta ou para ação no trato digestivo (DEFRAIN et al., 2005; FERRARETTO et al., 2011; KLINGERMAN et al., 2009; NOZIÈRE et al., 2014; VARGAS-RODRIGUEZ et al., 2014; WEISS; STEINBERG; ENGSTROM, 2011).

Da mesma forma, a aditivção de silagens com enzimas não é novidade (HENDERSON; MCDONALD, 1977; HENDERSON; MCDONALD; ANDERSON, 1982). A resposta de ruminantes à suplementação com enzimas exógenas é variável, certamente em decorrência da diferença nas enzimas testadas, tipo de substrato (dietas), dosagem e forma de fornecimento (TRICARICO; JOHNSTON; DAWSON, 1998).

Figura 3 - Classificação das enzimas de interesse para este trabalho, segundo IUBMB



### 2.4.1 Amilases

A primeira enzima descrita foi a amilase, descrita por Anselme Payen em 1833 (SUJANI; SERESINHE, 2015). Foram definidas como amilase, enzimas que quebram a cadeia de amido na presença de água, em uma reação hidrolítica. A hidrólise do amido é uma reação heterógena, envolvendo enzima no meio líquido e parte sólida do substrato que é o amido. Esse processo inclui a difusão da enzima no amido seguida por adsorção e subsequente catálise. O arranjo dos grânulos de amido nos grãos de cereais é uma barreira para a atividade enzimática, sendo esse um fator determinante da cinética da degradação do amido. As enzimas iniciam o ataque ao amido penetrando em poros no grânulo de amido e o processo de hidrólise ocorre de forma rápida no

sentido radial, da periferia para o centro do grânulo, formando novos canais. Dessa forma, a área de superfície aumenta e a hidrólise ocorre de dentro para fora (ZHANG; DHITAL; GIDLEY, 2013).

O grupo de enzimas amilase foi criado em 1992, com característica de atuar em ligação  $\alpha$ -glicosídica, ter quatro sítios de ligação ao substrato catalítico e ter os aminoácidos aspartato e glutamato na cadeia e nos sítios catalíticos, o aspartato. A família da alfa-amilase é composta por 30 enzimas distintas divididas em quatro grupos: a) endoamilase: quebra ligação  $\alpha$ -1,4 resultando em produtos  $\alpha$  anoméricos, b) exoamilase: quebra  $\alpha$ -1,4 ou  $\alpha$ -1,6 resultando em produtos  $\alpha$  e  $\beta$ , c) enzima desramificadora: hidrolizam  $\alpha$ -1,6 resultando em polissacarídeos lineares, d) transferase: quebra a ligação glicosídica e forma uma nova molécula com as partes geradas (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2006).

A classe de enzima alfa-amilase é de grande interesse comercial na indústria alimentícia, de papel e têxtil. A degradação industrial do amido começa com alfa-amilase. As alfa-amilases são extraídas do cultivo de microorganismos como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Aspergillus oryzae* (GUPTA et al., 2003). Cada sítio ativo da enzima tem afinidade por apenas uma unidade de glicose, podendo gerar na quebra produtos com 4 a 10 unidades de glicose, o que resulta em diferentes compostos. O tamanho da cadeia originada depende da origem da  $\alpha$ -amilase. A enzima originada de cultivo de *Pyrococcus furiosus*, por exemplo, a menor molécula resultante é a maltopentaose, com 5 moléculas de glicose (MCHOVIC; JANECEK, 2007).

A alfa-amilase (EC 3.2.1.1) tem o nome sistemático de 1,4- $\alpha$ -D-glicano-glicanohidrolase reagindo na endo-hidrólise aleatória de ligações (1-4)- $\alpha$ -D-glicosídicas em polissacarídeos. Outros nomes para a enzima são glicogenase,  $\alpha$ -amilase, endo-amilase ou taka-amilase A. A alfa-amilase da fermentação de *Aspergillus oryzae* tem como condições ótimas para ação pH 4 e temperatura de 50 °C, mas atua bem desde 37 até 50 °C (BRENDA..., 2016; CHANG; TANG;

LIN, 1995). Outra alfa-amilase, provinda do cultivo de *Bacillus licheniformes*, tem como principal característica a tolerância a diferentes temperaturas, atuando bem entre 25 a 100 °C. O pH da solução ótimo para essa enzima é de 5 a 9,5, com perda de 34% na efetividade em pH 4 e de 50% em pH 3 (BRENDA..., 2016; KRISHNAN; CHANDRA, 1983). O conhecimento da faixa ótima de pH de cada enzima pode direcionar seu uso na nutrição, principalmente para silagens, uma classe de alimento que sempre tem baixo pH.

Alfa-amilases são pouco exigentes em relação às condições ótimas de ação. Estudos com amilase provinda de diferentes micro-organismos concluíram que pH médio ótimo variou entre 5 e 6 (BACH; IGLESIAS; DEVANT, 2007; FREER, 1993; KLINGERMAN et al., 2009; NAJAFI; DEOBAGKAR, 2005; PLANCHOT et al., 1995; SINGH; SONI, 2001; UGURU et al., 1997). Com relação à temperatura, apesar da exigência ser particular e variável de acordo com o micro-organismo de origem, algumas enzimas são termoestáveis, tolerando ampla variação de temperatura sem reduzir sua ação. Alfa-amilases são metaloproteínas que contêm ao menos um íon  $\text{Ca}^{++}$  na cadeia. A presença de íons cálcio no meio da enzima a torna mais termoestável (GUPTA et al., 2003).

A sensibilidade térmica da alfa-amilase provinda de *Bacillus subtilis* foi estudada por Konsula e Liakopoulou-kyriakides (2004). A temperatura de melhor atividade foi de 60 °C, com redução de 100% da atividade na temperatura de 70 °C em apenas 120 min. Contudo, essa variação foi evitada quando uma fonte de cálcio foi acrescida à solução. Nessa segunda situação, a degradação do milho teve  $K_m$  máximo a 70 °C com curva de aparecimento de açúcar reduzido crescente em todo período de análise. A degradação final de 96,7% do milho foi obtida em 7 horas de reação.

No estudo da cinética de quebra do amido pela alfa-amilase, dois estágios de quebra foram identificados. A primeira fase é identificada com quebra inicial rápida de 10%/h com duração de 6 a 20 horas. Depois dessa fase,

a hidrólise reduz progressivamente até tornar-se nula. O amido isolado de milho foi quebrado totalmente em 30 horas. Ao analisar os subprodutos da hidrólise, a glicose foi o produto predominante e em maior concentração, em menor concentração, 100 vezes menos que glicose, foram identificadas a maltose e a maltotriose (PLANCHOT et al., 1995).

A ação de amilases sobre o amido difere nos parâmetros cinéticos da reação. Pesquisadores avaliaram três enzimas comerciais amilolíticas da empresa Novozyme: Termamyl, uma alfa-amilase de *Bacillus licheniformis*; San Super, uma amiloglicosidase de *Aspergillus niger* e BAN, uma alfa-amilase de *Bacillus amyloliquefaciens* (GUERRA; PASTRANA CASTRO, 2012). A reação foi realizada em pH 5 na temperatura de 40 °C. As três amilases tiveram sua velocidade de reação aumentada com aumento da concentração do substrato na solução até a concentração de 150 g/L. A velocidade máxima de reação ( $V_{m\acute{a}x}$ ) foi 33,9 mM/min para a San Super, 37,2 mM/min para a Termamyl e 68,9 mM/min para a BAN. A San Super além do menor  $V_{m\acute{a}x}$  foi a de pior desempenho em amido de menor degradabilidade, o que reduziu o  $V_{m\acute{a}x}$  para a metade do observado com amido mais degradável.

O ataque enzimático ao grão de amido pode ser acompanhado pela visualização em microscopia eletrônica. A alfa-amilase isolada em laboratório do cultivo de *Aspergillus fumigatus* foi adicionada ao amido. Após 48 h de hidrólise, 50 % do amido já havia sido degradado. Nesse momento uma amostra foi submetida à microscopia eletrônica de varredura (SEM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Nas fotos de SEM foi possível observar ranhuras e poros na superfície. Já nas fotos de TEM a ação no interior do grânulo foi identificada, indicando canais radiais e corrosão interna. Depois da formação de canais na superfície, a enzima agiu no centro do grânulo movendo-se para o lado de fora, hidrólise centrífuga (PLANCHOT et al., 1995). Certos da efetividade da enzima sobre o amido, pesquisadores propuseram usar a enzima

visando potencializar a digestão do milho na nutrição animal. Tricarico, Johnston e Dawson (2002) forneceram às vacas em lactação 0, 12, 24 ou 36 g/d do produto comercial fonte de enzima microbiana da empresa Alltech. Nos primeiros estudos com fornecimento de produto comercial enzimático para ruminantes, a descrição do tratamento era apenas em gramas do produto e pouco se relatava sobre a enzima. Os melhores resultados foram descritos para o tratamento com fornecimento de 12 g/d, com aumento de 1,6 L de leite na produção diária por animal e aumento na produção de gordura e proteína, somados à redução de 0,6 unidades percentuais no teor de nitrogênio ureico no leite.

Visando conhecer e comparar um novo produto enzimático os autores realizaram estudo *in vitro* com três enzimas (KLINGERMAN et al., 2009). Uma alfa-amilase comercial, foi o produto da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* e *Aspergillus oryzae* (AMA). A segunda foi uma enzima experimental líquida (7B) e a terceira uma alfa-amilase da fermentação de *Aspergillus oryzae*, purificada para reagente laboratorial (SAM). O produto comercial AMA apresentou pior desempenho na quebra do amido que os outros dois produtos. A enzima AMA atuou melhor em pH 5,4 com atividade de 290 CU/g, a 7B em pH 6,0 com 6.400 CU/ml de atividade e a SAM em pH 5,4 com 32.000 CU/ml de atividade. Para avaliar a enzima 7B, esta foi testada em diferentes doses com diferentes híbridos de milho na incubação *in vitro*. Milho duro e semiduro foram mais degradados com o aumento da quantidade de enzima na incubação.

Amiloglicosidase ou também conhecida como glicoamilase, tem o nome sistemático 4- $\alpha$ -D-glicano-glicohidrolase, e o nome comum, de glicano-1,4-alfa-glicohidrolase. Na IUBMB recebe o código EC 3.2.1.3. Outros nomes são listados: como  $\gamma$ -amilase, lisossomal- $\alpha$ -glicosidase, maltase ácida, exo-1,4- $\alpha$ -glicosidase, glicose amilase. Sua reação é de hidrólise da ligação (1-4) e (1-6)  $\alpha$ -D-glicose, com liberação de  $\beta$ -D-glicose. A amiloglicosidase obtida do cultivo

de *Aspergillus niger* tem temperatura ótima de ação de 40 a 50 °C e em solução com pH entre 4,8 a 5 (BRENDA, 2016; LOPEZ et al., 2005).

O efeito da amiloglicosidase de *Aspergillus niger* sobre a degradação de ração total, acompanhado pela fermentação e produção de gás *in vitro* foi estudado por Salem et al. (2015). As quantidades testadas de enzimas foram 0, 1,5 ou 3 g de enzima por kg de milho grão da dieta. Duas dietas foram testadas, uma com 25% da MS de milho ou outra com a mesma proporção de sorgo. As dietas foram secas e moídas até o tamanho de 1 mm. As enzimas foram adicionadas à dieta imediatamente antes da incubação. A adição da enzima não teve efeito sobre a cinética de produção de gás, digestibilidade da MS ou FDN. Uma maior produção de gás com adição de enzima foi observada no tempo de 12 h para a concentração maior de enzima ( $P = 0,05$ ). Os autores atribuem o pH à falta de resposta à inclusão da enzima, pois o valor ideal para a máxima atividade enzimática é de 4,5 e o pH da solução era de 5,8.

Como uma enzima de ação exo, a amiloglicosidase hidrolisa o polímero de glicose da extremidade não redutora da cadeia de amido, quebrando ligações  $\alpha$  1-4 e  $\alpha$  1-6. Recentes estudos indicam que a amiloglicosidase não só se liga ao amido pelas extremidades, mas também desestrutura as ligações helicoidais facilitando a hidrólise por outras enzimas. Considerando a possibilidade de potencialização na quebra do amido, a ação exo da amiloglicosidase foi somada à ação endo da alfa-amilase, um estudo foi desenvolvido. Os resultados positivos mostraram que a teoria estava certa, os efeitos das enzimas foram potencializados. A alfa-amilase por sua ação no meio da cadeia de amido quebrou em mais estruturas e mais extremidades ficaram disponíveis para a ação da amiloglicosidase. Esta última, por sua vez, quebrando as extremidades, abriu caminho através da desestruturação da conformação da molécula para a ação da alfa-amilase. Além disso, os autores levantaram que em sistemas *in vitro*, alfa-amilase é inibida por oligossacarídeos e a amiloglicosidase degrada esses

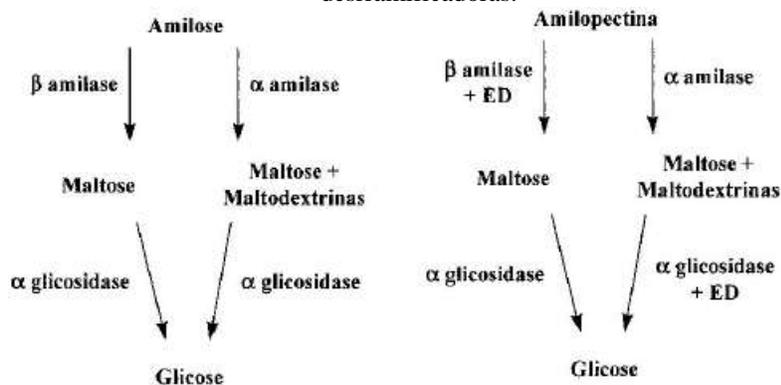
compostos em glicose, reduzindo a inibição (ZHANG; DHITAL; GIDLEY, 2013). A resposta positiva dessas duas enzimas somadas ainda não foi testada na nutrição animal.

Outro trabalho *in situ* contrastou a ação da amilase com a amiloglicosidase sobre o milho e o sorgo (GUTIÉRREZ et al., 2005). A amilase provém de *Bacillus licheniformis* foi testada na concentração de 0, 30, 50 e 60  $\mu$ l por grama de MS de grão. Enquanto a amiloglicosidase de *Aspergillus niger* foi adicionada nas concentrações de 0, 50, 70 e 90  $\mu$ l por grama de MS de grão. Concentrações diferentes foram adotadas visando adicionar a mesma quantidade de proteína em gramas. Os grãos foram moídos a 1 mm e receberam uma das enzimas 24 horas antes da incubação *in vitro*. A digestibilidade da MS foi maior com adição da amilase na concentração maior, com valores de 53,21 sem enzima e 83,92 % da MS para a dose de 90 no milho e 58,52 sem enzima e 85,09% da MS para a dose de 90 no sorgo ( $P < 0,01$ ). Os valores para a inclusão da mesma quantidade de amiloglicosidase foram 76,33% da MS do milho e 81,11% da MS do sorgo.

A quebra enzimática do amido a glicose envolve a ação de  $\alpha$  e  $\beta$  amilases e  $\alpha$  glicosidase (Figura 4). Tanto a amilose como a amilopectina são degradadas por  $\alpha$ -amilases (EC 3.2.1.1) que atuam aleatoriamente na molécula de amido liberando oligossacarídeos de baixo peso molecular (maltodextrinas) e maltose. Ocorre também degradação da amilose por  $\beta$ -amilase (EC 3.2.1.2) que remove unidades sucessivas de maltose a partir da extremidade redutora da cadeia de amido. Cadeias de amido ligadas  $\alpha$ -1,6 (pontos de ramificação em amilopectina) inibem a ação da  $\beta$ -amilase. A hidrólise completa da amilopectina requer a presença de enzimas capazes de quebrar ligações  $\alpha$ -1,6, como amiloglicosidase (EC 3.2.1.3) e enzimas desramificadoras como  $\alpha$ -dextrina 6-glicanohidrolase (Pullulanase, EC 3.2.1.41) e isoamilase (EC 3.2.1.68). A

maltose liberada é degradada a glicose por ação da  $\alpha$ -glicosidase (EC 3.2.1.20) (HOBSON; STEWART, 1997).

Figura 4 - Esquema simplificado da quebra enzimática do amido. ED = Enzimas desramificadoras.



Duas amiloglicosidases foram testadas em ensilagem de grão reidratado. Grãos de milho e sorgo foram moídos finos, hidratados (35% de umidade) e tratados com uma das amiloglicosidases (AMG e Sanferm) na quantidade de 0,35 ml/kg e foram ensilados em silos laboratoriais com capacidade de 4 Kg. Neste trabalho os resultados não foram satisfatórios com efeitos negativos em relação à adição de enzima, como aumento da perda de matéria seca (3,8 Controle, 7,7 AMG e 6,5 Sanferm;  $P < 0,02$ ) e aumento do pH (3,92 Controle, 3,94 AMG e 4,01 Sanferm;  $P = 0,03$ ). Amostras de silagem foram incubadas *in vitro*, e a enzima aumentou a taxa de degradação da fração solúvel (tempo 0), mas não alterou a degradação da MS (FERNANDES et al., 2016).

#### 2.4.2 Proteases

Proteases, também conhecidas como peptidase, proteinase ou enzima proteolítica, são enzimas que hidrolisam cadeias peptídicas. Proteases são

agrupadas pelo tipo de reação de catálise (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2007). Endopeptidases hidrolisam cadeias alfa peptídicas a cadeias polipeptídicas por ação interna na molécula proteica, tendendo a agir próximo ao N-terminal ou C-terminal. Exemplo de endopeptidases são a quimiotripsina, a pepsina e a papaína. Geralmente, endopeptidases começam a quebra de alimentos proteicos, para então agirem na sequência da proteólise as exopeptidases, que requerem o grupo N-terminal e C-terminal livres. O terceiro tipo de protease é a ômega-peptidase, essa age próximo aos aminoácidos terminais da cadeia proteica.

Young et al. (2012) avaliaram a adição de protease exógena oriunda de *Aspergillus niger* à forragem de milho no momento da ensilagem. A protease foi adicionada em doses de 20 ou 2.000 mg/kg de MS da forragem. A silagem foi avaliada aos 45 e 150 dias após a ensilagem. A adição de protease aumentou o teor de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal na silagem, sugerindo que houve maior degradação proteica durante a ensilagem. A degradabilidade ruminal do amido, determinada por incubação *in vitro* por 7 horas, foi 66,3% antes da ensilagem e aumentou para 80,6% após 45 d de ensilagem no tratamento com enzima na dose maior e foi 73,5% no controle. A diferença expressa apenas em gráfico no trabalho foi ainda maior no tempo de 150 dias de ensilagem ( $P < 0,01$ ), com maior ganho da digestibilidade do amido.

Windle, Walker e Kung Júnior (2014) avaliaram a adição de protease à silagem da planta de milho diferindo no estágio de maturidade da planta à colheita. Forragens de milho foram colhidas quando as plantas tinham 30,7% ou 40,3% de MS. Silos com 500 g de forragem foram confeccionados em sacos plásticos com barreira de ar, em números de 5 repetições. As silagens foram abertas 45, 90 e 150 dias após a ensilagem. A silagem com protease aos 45 dias após a ensilagem teve teor similar de proteína solúvel ao da silagem controle aos 90 dias de ensilagem, sugerindo que houve maior taxa de proteólise no silo em

resposta à enzima. A digestibilidade do amido foi estudada em digestibilidade *in vitro* com tempo de incubação de 7 horas. A inclusão de protease à silagem aumentou mais a digestibilidade do amido na silagem com maior teor de MS do que na forragem imatura. A silagem acrescida de protease teve digestibilidade do amido aos 45 d de ensilagem similar à digestibilidade do amido da silagem armazenada sem enzima por 150 dias.

Kung, Windle e Walker (2014) avaliaram o uso de protease em silagem de grão úmido de milho. Os silos experimentais foram confeccionados em sacos embalados a vácuo e abertos com 70 ou 140 dias. As silagens com protease tiveram maior concentração de proteína solúvel e nitrogênio amoniacal e menor teor de prolamina que a silagem controle. A protease reduziu o teor de prolamina aos 70 dias de ensilagem de 3,16 para 2,32% da MS e de 2,90 para 1,82% da MS aos 140 dias de ensilagem ( $P < 0,01$ ). A redução da prolamina pode estar relacionada ao ganho em digestibilidade do amido na silagem tratada com protease. A degradabilidade ruminal do amido *in vitro* foi 44,0% no controle e 47,4% com protease. A adição de protease faz do amido da silagem aos 70 d mais digestível (61,88%) do que em silagem não tratada aos 170 d (58,34%).

Ferraretto, Fredin e Shaver (2015) avaliaram o uso de protease oriunda de *Bacillus licheniformis* na ensilagem por 30 dias de grão de milho úmido e de grão maduro reidratado. Tanto a ensilagem quanto o uso de protease aumentaram a digestibilidade *in vitro* do amido em 7 horas de incubação ruminal. Ganho em digestibilidade do amido da silagem foi acompanhado de aumento no teor de proteína solúvel. Esses autores também observaram que a hidratação do milho sem ensilagem não aumentou a digestibilidade desse alimento.

## REFERÊNCIAS

- ÅKERBERG, C. et al. A kinetic model for enzymatic wheat starch saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 306–314, 2000.
- ANDRADE FILHO, R. et al. Degradabilidade ruminal in situ de grãos de milho maduros do tipo flint ou dentado, secos ou reconstituídos e ensilados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. **Anais...**Salvador: UFBA, 2010a.
- ANDRADE FILHO, R. et al. Reconstituição, inoculação e ensilagem de grãos de milho maduros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador.. **Anais...**Salvador: UFBA, 2010b.
- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 60, 2016.
- BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, n. 1/2, p. 146–153, July 2007.
- BITENCOURT, L. L. **Substituição de milho moido por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012.
- BRENDA the comprehensive enzyme informatio system. 2016. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Hoboken: J. Wiley, 2000.
- BURROUGHS, W. et al. Enzyme addition to fattening cattle rations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 19, p. 458–464, 1960.
- CALIFORNIA PELLET MILL, C. **No title**. Disponível em: <<http://www.cpm.net/downloads/Advantages and Disadvantages of Particle Size Reduction Techniques.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

CARVALHO, P. A. et al. Shifts on bacterial population of high moisture corn silages and its correlation with fermentation end-products. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2015. 1 CD-ROM.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 8, n. 2, p. 130–132, 1962.

CORONA, L.; OWENS, F. N.; ZINN, R. A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 3020–3031, 2006.

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

COSTA, F. M. J. et al. Silagem de grãos úmidos de milho de textura dura ou macia em dietas com polpa cítrica para vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, p. 203–210, 2014.

DAVIDE, L. M. C.; RAMALHO, M. A. P. Assessment of genetic parameters of degradability in maize grains due to indentation scores. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 11, p. 10–16, 2011.

DEFRAIN, J. M. et al. Effects of dietary alpha-amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4405–4413, 2005.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 70, p. 105–108, 1993.

FERNANDES, J. **Influência de genótipo , maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. Piracicaba: Universidade de São Paulo; Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”, 2014.

FERNANDES, T. et al. Effect of glucoamylase and duration of silage storage on ruminal degradation and dry matter loss of corn and sorghum grain rehydrated and ensiled. In: JOINT ANNUAL MEETING , 1., 2016, Salt Lake. **Anais...** Salt Lake: ASAS, 2016.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 1, p. 395–405, 2015.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 3, p. 1490–1499, 2011.

FERRARETTO, L. F. et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 5, p. 3221–3227, 2014.

FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 12, p. 7318–7327, 2015.

FREDIN, S. M. et al. Effects of corn-based diet starch content and corn particle size on lactation performance, digestibility, and bacterial protein flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 1, p. 541–553, 2015.

FREER, S. N. Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1398–1402, 1993.

FREY, P. A.; HEGEMAN, A. D. **Enzymatic reaction mechanisms**. 2nd ed. New York: Oxford, 2007.

GIUBERTI, G. et al. Evaluation of the impact of maize endosperm vitreousness on in vitro starch digestion, dry matter digestibility and fermentation characteristics for pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 186, n. 1/2, p. 71–80, 2013.

GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. A comparison of methods to quantify prolamin protein contents in cereals. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 10, p. 7–13, 2011.

GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. Quantification of zeins from corn, high-moisture corn, and corn silage using a turbidimetric method: Comparative efficiencies of isopropyl and tert-butyl alcohols. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 95, p. 3384–3389, 2012.

GOODRICH, R. D.; BYERS, F. M.; MEISKE, J. C. Influence of moisture content, processing and reconstitution on the fermentation of corn grain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 41, n. 3, p. 876–881, 1975.

GUERRA, N. P.; PASTRANA CASTRO, L. **Modelling the effects of ageing time of starch on the enzymatic activity of three amylolytic enzymes**. 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/402439/>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

GUPTA, R. et al. Microbial alfa-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1599–1616, 2003.

GUTIÉRREZ, C. et al. Effect of exogenous amylase or glucoamylase dose on in situ ruminal digestion of corn and sorghum. **Journal of Applied Animal Research**, Izatnagar, v. 27, n. 1, p. 7–10, 2005.

HAMAKER, B. R. et al. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 72, p. 583–588, 1995.

HARMON, D. L.; YAMKA, R. M.; ELAM, N. A. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 84, p. 309–318, 2004.

HARRELSON, F. W. et al. Influence of corn hybrid and processing method on nutrient digestibility, finishing performance, and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 2323–2332, 2009.

HENDERSON, A. R.; MCDONALD, P.; ANDERSON, D. The effect of a cellulose preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during the ensilage of grass, lucerne and clover. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 33, p. 16–19, 1982.

HENDERSON, A. R.; MCDONALD, P. The effect of cellulase preparations on the chemical changes during the ensilage of grass in laboratory silos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 28, p. 486–488, 1977.

HERON, S. J. E.; EDWARDS, R. A.; MCDONALD, P. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, n. 37, p. 979–985, 1986.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

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, 2012.

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

HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. **A Guide to understanding vitreousness and prolamins in corn**. Disponível em: <[https://shaverlab.dysci.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/87/2015/04/FGES-ProlaminGuidev2.0\\_000.pdf](https://shaverlab.dysci.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/87/2015/04/FGES-ProlaminGuidev2.0_000.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2016.

HOLDING, D. R. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, p. 276, 2014.

HUNTINGTON, G. B.; HARMON, D. L.; RICHARDS, C. J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 14–24, 2006. Suppl.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. **Current Science**, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 125–135, July 2005.

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

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Hydrolysis of starches by the action of an alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 1745–1749, 2004.

KUNG, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal**

**of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 3, p. 1707–1712, Mar. 2014.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for amino nitrogen as nonprotein, true proteins, salt-soluble proteins, zeins and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 77, p. 620–626, 2002.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Protein Distribution Pattern in Floury and Vitreous Endosperm of Maize Grain. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 153–158, 2004.

LARSON, J.; HOFFMAN, P. C. Technical note: a method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 4834–4839, Dec. 2008.

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

MCHOVIC, M.; JANECEK, S. Amylolytic enzymes: types, structures and specificities. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (Ed.). **Industrial enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 3–19.

MCLAREN, R. J.; MATSUSHIMA, K. Digestion of ensiled reconstituted corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 27, p. 1171, 1968.

MENDES, I. A. P. **Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagem e grão de milho moído reidratado substituindo milho seco moído do concentrado**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

MOHARRERY, A.; LARSEN, M.; WEISBJERG, M. R. Starch digestion in the rumen, small intestine, and hind gut of dairy cows: a meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 192, p. 1–14, 2014.

MORAIS, G. et al. A review on additives for grain silages. In: INTERNATIONAL CONFERENCE FORAGE CONSERVATION, 17., 2016, High Tatras. **Proceedings...** High Tatras: NAFC, 2016. 1 CD-ROM.

MORAIS, G. et al. Effects of chemical and microbial additives on the fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: USP, 2015. 1 CD-ROM.

- MOTTA, V. T. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2011.
- NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, Madison, v. 41, p. 349–354, 2005.
- NELLIS, S. E.; HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. Technical note: a modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 7, p. 4647–52, 2013.
- NOZIÈRE, P. et al. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 4, p. 2319–2328, 2014.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 184–194, 2003.
- OWENS, F. N. **Impact of grain processing and quality on holstein steer performance**. Disponível em: <<http://www.extension.umn.edu/agriculture/dairy/beef/impact-of-grain-processing-and-quality.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Circular Técnica, 75).
- PEREIRA, M. N.; BARBOSA, E. F.; PEREIRA, R. A. N. Relationship between total tract starch digestibility and fecal starch content in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 360, 2015. Suppl.
- PEREIRA, M. N. et al. Silagem de milho reidratado na alimentação do gado leiteiro. **Informe Agropecuário Epamig**, Belo Horizonte, v. 37, p. 7–18, 2013.
- PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, n. 1/2, p. 25–35, 1997.
- PLANCHOT, V. et al. Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *aspergillus fumigatus*. **Journal of Cereal Science**, London, v. 21, p. 163–171, 1995.

RAUSCH, K. D. et al. Particle size distributions of ground corn and ddgs from dry grind processing. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, Saint Joseph, v. 48, n. 1, p. 273–277, 2005.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. An introduction to peptidases and the merops database. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (Ed.). **Industrial enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 161–180.

RÉMOND, D. et al. Effect of corn particle size on site and extent of starch digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1389–1399, 2004.

REZENDE, A. V. et al. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 197, p. 213–221, 2014.

RODRIGUES, D. E. et al. **Avaliação do desempenho do desintegrador/picador /moedor (DPM) na moagem do milho**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000.

SALEM, A. Z. M. et al. Effect of glucoamylase enzyme extract on in vitro gas production and degradability of two diets with 25% of corn or sorghum grains. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 85, n. 2, p. 183–188, 2015.

SCHAEFER, D. M. et al. Inoculation of corn silage and high-moisture corn with lactic acid bacteria and its effects on the subsequent fermentations and on feedlot performance of beef steers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 23–38, 1989.

SIMPSON, D. J. Proteolytic degradation of cereal prolamins: the problem with proline. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 825–838, 2001.

SINGH, H.; SONI, S. K. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 453–459, 2001.

SIVARAMAKRISHNAN, S. et al. alpha-amylases from microbial sources - An overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 173–184, 2006.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous Enzymes in Ruminant Nutrition: a review. **Asian Journal of Animal Sciences**, Dubai, v. 9, n. 3, p. 85–99, 2015.

TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 1413–1424, 2005.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. The potential of supplemental enzymes in dairy and feedlot diets : fungal amylase Alltech's. In: ANNUAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, 2002. 1 CD-ROM.

UGURU, G. C. et al. Purification, characterization and mutagenic enhancement of a thermoactive alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. **Journal Industry Microbiology and Biotechnology**, Cham, v. 19, p. 273–279, 1997.

VARGAS-RODRIGUEZ, C. F. et al. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 7, p. 4464–70, 2014.

WEISS, W. P.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 5, p. 2492–2499, 2011.

WINDLE, M. C.; WALKER, N.; KUNG JÚNIOR, L. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 5, p. 3053–3060, 2014.

YOUNG, K. M. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 11, p. 6687–6694, 2012.

ZHANG, B.; DHITAL, S.; GIDLEY, M. J. Synergistic and antagonistic effects of  $\alpha$  - amylase and amyloglucosidase on starch digestion. **Biomacromolecules**, Washington, v. 14, p. 1945–1954, 2013.

**ARTIGO**

**EFFECT OF ENZYMES, PARTICLE SIZE, DURATION OF STORAGE,  
AND KERNEL VITREOUSNESS ON THE DIGESTIBILITY OF  
REHYDRATED CORN GRAIN SILAGE**

N. M. Lopes<sup>‡</sup>, G. S. Dias Junior<sup>‡</sup>, M. E. Weatherly\*, F. C. Cardoso\* and  
M. N. Pereira<sup>‡</sup>

<sup>‡</sup>Federal University of Lavras, Lavras, MG, Brazil

\*University of Illinois, Urbana, IL, USA

## INTRODUCTION

Corn vitreousness, or grain hardness, has a negative impact on kernel digestibility, since it reflects the degree of prolamin (zein) cross-linking with starch granules in the endosperm (MCALLISTER et al., 1993; PEREIRA et al., 2004; PHILIPPEAU; MICHALET-DOREAU, 1997). Flint (hard) corn hybrids are rich in vitreous endosperm, while in soft corn the floury endosperm prevails over the more packed and dense vitreous regions of the kernel (CORREA et al., 2002; PHILIPPEAU et al., 1999).

Rehydrated and ensiled corn (**REC**) is the product of homogeneous addition of water to ground mature kernels in order to obtain more than 30% moisture concentration for ensiling. Compared with the traditional storage as silage of high-moisture corn (**HMC**), REC has the advantage of allowing for a wider harvesting window of the crop or for strategic purchasing of mature dry grain. Compared with mature ground corn, REC can concentrate the grinding operation, requires less investment in equipment and facilities for grain storage, and can reduce transportation and storage costs. Additionally, REC allows for the cultivation of floury hybrids in regions where kernel damage of soft corn during harvesting, drying, and storage is significantly larger than flint corn. Partial rehydration is also a plausible practice for HMC with excessive DM concentration. The silage of REC has been shown to be as effective as HMC silage in reducing the prolamin content of corn (FERNANDES, 2014). Rehydration and ensiling of mature flint corn proportionally increased grain *in vitro* digestibility more than in floury corn (ANDRADE FILHO et al., 2010a). However, when HMC of flint or floury corn was fed to dairy cows, the milk yield to feed intake ratio and the intake of digestible organic matter were both improved by the floury hybrid, suggesting that ensiling did not completely

compensate for the negative impact of degree of corn hardness on digestibility (COSTA et al., 2014).

The effectiveness of ensiling as a strategy for manipulating corn digestibility can be dependent on particle size of the ensiled grain and duration of storage in the silo. Large particle size increases the rate of grinding and reduces energy expenditure per unit of REC but can decrease the change in digestibility in response to ensiling. Baron, Stevenson e Buchanan-Smith (1986) observed that ensiled corn grain ground to pass through a 8 mm mesh screen had higher soluble and non-protein N as proportions of total N than whole kernels, suggesting that grain particle size can determine proteolysis during ensiling. Protein breakdown at 30 d of ensiling was larger for ground corn, but whole kernels had greater increase in protein breakdown when ensiled for 90 d. The negative impact of coarse grinding on starch digestibility may be compensated by the increased prolamin degradation in extended silage storage (FERRARETTO et al., 2014; KUNG; WINDLE; WALKER, 2014), especially for flint hybrids.

The use of enzymes at ensiling may be a strategy to manipulate corn starch digestibility. Protease addition at ensiling have increased HMC (KUNG; WINDLE; WALKER, 2014), REC (FERRARETTO et al., 2015), and whole-plant corn silage (YOUNG et al., 2012) *in vitro* digestibility, plausibly by increased prolamin degradation. The breakdown of starch molecules with amylases and of structural carbohydrates with pectinases and fibrolytic enzymes may be other plausible strategies to manipulate REC ruminal fermentability, although it has not been evaluated. It is known that the action of enzymes is dependent on pH and temperature for maximum reaction rate (TAYLOR, 2002). Although silage pH and temperature may not be always ideal for a given enzyme, the extended storage of corn in the silo may allow for adequate enzyme action, even at a reduced reaction rate. The aerobic (respiratory) and anaerobic

(fermentative) phases of silage also induce variation in pH and temperature that may allow for short-term optimum for an enzyme. A mixture of enzymes may also have a distinct effect on REC digestibility than enzymes in single form.

Three experiments were performed to evaluate the effectiveness of amylases associated or not with other enzymes as tools for improving the *in vitro* ruminal digestibility of REC. The  $\alpha$  amylases and amyloglucosidases were associated with proteases and with enzymes for the breakdown of structural carbohydrates. The ensilage of flint and floury corn was evaluated as a strategy for improving starch digestibility by prolamin degradation and the effects of the duration of silage storage and particle size on the change in silage digestibility. The objective was to explore the possibility of using enzymes as silage additives for REC.

## MATERIALS AND METHODS

### *Experimental Design and Treatments*

**Experiment 1.** This experiment was designed as a completely randomized design (CRD) with a 3 x 4 factorial arrangement of enzymes in factor 1 (Control,  $\alpha$  Amylase 1,  $\alpha$  Amylase 2) and factor 2 (Control, Amyloglucosidase 1, Protease 1, Fibrolytic). Mature kernels of a Brazilian flint hybrid (AG 8041, Sementes Agrocere, Uberlândia, Brazil) were ground with a 3 mm mesh screen in a TN-8 stationary mill (Nogueira Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista, Brazil). Ground corn composition and particle size are described in Table 1. The ground grain formed 12 piles of 23 kg and received a combination of treatments in factors 1 and 2. All piles were hydrated by manual mixing of 8 L of water. The enzymes, all in liquid form, were added at a dosage of 0.35 mL/kg of corn after dilution in 160 mL of water for spraying and thoroughly mixing to the

rehydrated grain. Corn piles for the control treatment were sprayed with pure water.

Enzymes were purchased from a dealer of the producer (Novozymes Latin America, Araucária, Brazil). The  $\alpha$  Amylase 1 (EC 3.2.1.1), from *Aspergillus oryzae*, was described as having good activity at pH 4 and temperature from 37 to 50 °C (Fungamyl. 800 FAU/g). The  $\alpha$  Amylase 2, originated from *Bacillus licheniformes*, had good activity in temperature ranging from 25 to 100 °C and pH 5 to 9.5 (Thermamyl. 240 KNU-T/g). Amyloglucosidase 1 (EC 3.2.1.3) from *Aspergillus niger* had good activity at 40 to 50 °C and pH 4.8 to 5 (AMG. 300 AGU/mL). Protease 1 (EC 3.4.21.62) from *Bacillus licheniformis* had optimum temperature at 30°C and good activity from 25 to 60 °C and pH 7 to 10.5 (Alcalase. 2.4 AU-A/g). The Fibrolytic enzyme from *Aspergillus aculeatus* was declared to be a pectinase (EC 3.1.1.11) with some xylanase, cellulase, and hemicellulase activity at pH 4.5 to 8 and temperature from 50 to 80 °C (Viscozyme. 100 FBG/g).

Experimental units were 84 plastic pipe mini-silos with 60 cm of height and 10 cm of diameter, with steel weight for compression, rubber rings to exclude oxygen, and Bunsen type valves for gas release and effluent removal. Seven silos per treatment were filled with  $4.191 \pm 0.151$  kg of rehydrated corn. Silos were stored at room temperature until opening 81 days after ensiling. Samples of the 7 silos treated only with Amyloglucosidase 1 and of the 7 silos treated only with water were analyzed for prolamin concentration and the ruminal digestibility was evaluated with an *in vitro* gas system. This subset of data was analyzed as a CRD with two treatments.

**Experiment 2.** This experiment was a CRD with a 2 x 2 x 3 x 3 factorial arrangement of endosperm type (Flint, Floury), particle size (Fine, Coarse), enzymes ( $\alpha$  Amylase 3, Protease 2,  $\alpha$  Amylase 3 + Protease 2), and duration of ensiling (30, 90, and 120 days). Kernels of mature corn hybrids were ground and

hydrated to obtain more than 30 % moisture for ensiling. The floury corn was obtained from the University of Illinois dairy barn and represented a non-specified hybrid and red flint was purchased in an Illinois seed store. The solid enzymes were obtained from DSM Nutritional Products (Parsippany, NJ). The  $\alpha$  Amylase 3 from *Bacillus licheniformis* was applied at the rate of 650 mg/kg of corn (Ronozyme RumiStar. 600 KNU/g). Protease 2, also from *Bacillus licheniformis*, was applied at the rate of 200 mg/kg of corn (Ronozyme ProAct. 75,000 PROT/g). Corn grinding was performed with 3 and 8 mm mesh diameter screens with a hammer mill (Model 4DSF8. Jacobs Corporation, Harlan, IA). Experimental units were 180 nylon-polyethylene vacuum-sealed bags (38 cm x 41 cm. Foodsaver Industry, Brampton, Canada) filled with 1.00 kg of rehydrated corn, with five replicates per treatment.

**Experiment 3.** This experiment was a CRD with a 2 x 2 x 2 factorial arrangement of enzyme (Control, Amyloglucosidase 2), particle size (Fine, Coarse), and 30 or 250 days of silage storage. The liquid Amyloglucosidase 2 (Sanferm Yield. 120 AGU/g) was developed for the alcohol industry and was applied at the dosage of 0.35 mL/kg of corn. The same non-specific floury corn hybrid of Experiment 2 was hydrated and ensiled. Grinding procedures and experimental silos (5/treatment) were the same as described for Experiment 2.

### **Laboratory Procedures**

Corn vitreousness was determined by manual dissection of the kernels (DOMBRINK-KURTZMAN; BIETZ, 1993). From a sample of 100 kernels, 10 groups of visually homogeneous kernels were formed based on size and form. One randomly chosen kernel from each group was soaked in water for 3 min, dried with a paper towel, the pericarp and germ were separated from the endosperm by dissection with a scalpel, and the total endosperm was weighed. The floury endosperm was then manually removed using a scalpel and the

weight of the remaining vitreous endosperm was expressed as a percentage of the total endosperm.

At opening, silages were weighted and the pH was measured in a solution formed by stirring 25 g of silage with 225 mL of distilled water for 1 min was measured immediately after silage unloading. Before analyses, all samples were frozen for 5 days. Silage samples were ground through a 1 mm mesh screen with a Thomas-Willey mill before ruminal incubations and composition analysis. The non-volatile DM concentration before and after ensiling was determined by drying in a forced-air oven at 55°C for 72 h and then the ground sample at 100°C for 24 h. The loss of DM during ensiling was calculated by subtracting the amount of residual silage DM from the ensiled DM. The concentration of CP was determined with a Micro Kjeldahl steamer distiller (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1975). Starch concentration was analyzed enzymatically as in Hall (2009). The ammonia-N concentration was analyzed with a catalyzed indophenol reaction as in Chaney and Marbach (1962). Prolamin was quantified with a turbimetric procedure following the recommendations of Nellis, Hoffman e Shaver (2013), with borate-phosphate buffer and *tert*-butyl alcohol. Prolamins were quantified by the Bradford protein assay.

Silages ruminal *in vitro* digestibility were evaluated by different procedures across and within experiments. In Experiment 1, ruminal DM and starch degradation were determined with incubations for 3 (DM Deg 3 and Starch Deg 3) and 7 h (DM Deg 7 and Starch Deg 7). In Experiments 2 and 3, DM degradation was determined with incubations for 3, 7, and 18 h (DM Deg 18). Rumen fluid was obtained from a lactating Holstein cow fitted with rumen-cannula and fed on a corn silage, ground corn, and soybean meal based diet. The flask containing rumen fluid and buffer solution was sealed and placed in a 39 °C shaking water bath according to the recommendations for the first step of the

procedure of Tilley and Terry (1963). In Experiment 2, the fractional degradation rate (**kd**) was estimated by linearly regressing the natural logarithm of the incubation residue as a proportion of the initial sample size (residue/incubated) for the 3 and 7 h, 3 and 18 h, 7 and 18 h, and 3, 7, and 18 h incubations.

In Experiments 1 and 2, *in vitro* gas production measurements were performed with an automated system (Ankom-RFS system. Ankom Technology Corp., Macedon, NY). The cumulative gas production was recorded at 15-min intervals for 24 h. The value of the recorded pressure was transformed to gas volume by the equation:  $n = p (V/RT)$ , where,  $n$  = gas produced in moles,  $p$  = pressure in kilopascal,  $V$  = head-space volume in the glass bottle in liters,  $T$  = temperature in degrees kelvin, and  $R$  = gas constant ( $8.314472 \text{ L kPa K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ). The NLIN procedure of SAS (SAS v. 9.3, Institute. Inc., Cary, NC) was used to fit a 1-pool model to represent gas accumulation over time (Schofield et al., 1994):  $V_t = V_0 \exp \{-\exp [1 - kd (t - \text{Lag})]\}$ , where,  $V_t$  = gas volume at time  $t$ ,  $V_0$  = the asymptotic cumulative gas volume,  $kd$  = the fractional degradation rate,  $\text{Lag}$  = lag time, and  $t$  = time in hours. Gas accumulated in 3, 7, and 18 h was estimated for each silo using the equation parameters of the sample.

Electron microscopy analysis of starch granules in the endosperm was performed for samples of the Control and Amyloglucosidase 1 treatments of Experiment 1 (Hitachi S-4700 Transmission Electron Microscope, Tokyo, Japan). Samples were fixed in Karnovsky's fixative diluted in phosphate buffer with 2% glutaraldehyde and 2.5% paraformaldehyde (KARNOVSKY, 1965).

### ***Statistical Analysis***

Data was analyzed with the Mixed procedure of SAS (v 9.3. SAS Institute Inc, Cary, NC). The main effects and the 2-factor, 3-factor, and when possible, the 4-factor interactions among the main effects were included in the models. Pairwise t test was used to compare means when a  $P \leq 0.07$  was detected for the

main effects or interactions. The  $P$ -value was considered significant at  $P \leq 0.05$ , trend at  $P \leq 0.10$ , and weak trend at  $P \leq 0.15$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### *Corn before Ensiling*

Based on kernel vitreousness, the flint and floury grain used in the experiments represented a reasonable amplitude of corn hardness (Table 1). The samples of the corn populations of Brazil (5 hybrids) and USA (14 hybrids) evaluated by Correa et al. (2002) ranged from 34.9 % to 80 % vitreousness and the mean of each country was 73.1 % and 48.2 %, respectively. In this experiment, flint kernels had around + 25 % units more vitreous endosperm than floury corn. The north-American red flint hybrid of experiment 2 was as vitreous as the Brazilian flint hybrid of experiment 1.

Kernels of flint corn had similar starch concentration in DM and higher CP concentration than floury corn (Table 1). A smaller proportion of CP was prolamin and the geometrical mean particle size (**GMPS**) of the grain milled with the same equipment was smaller for floury than flint. Corn grain hardness is inherently confounded with GMPS, as previously observed by others (COSTA et al., 2014; RAUSCH et al., 2005). The low vitreous endosperm content and the small particle size of floury corn determine its improved digestibility compared to equally processed flint corn at the same stage of maturity (CORREA et al., 2002; RÉMOND et al., 2004), and plausibly a different response in digestibility to ensiling.

### *Silage pH*

The pH around 4 is suggestive of well-preserved silage (WOOLFORD, 1984) in all experiments (Tables 2, 3, and 4). Mean treatment pH ranged from 3.77 to 3.98 in experiment 1 (Table 2), from 3.98 to 4.07 in experiment 2 (Table

3), and from 4.09 to 4.46 in experiment 3 (Table 4). In experiment 1, Fibrolytic reduced silage pH 81 days after ensiling and  $\alpha$  Amylase 2, Amyloglucosidase 1, and Protease 1 increased pH (Table 2). However, when addition to the silage was in pure form or associated to  $\alpha$  Amylase 2, Fibrolytic reduced pH in comparison to Control, but it increased pH over Control when associated to  $\alpha$  Amylase 1 (Figure 1). Amyloglucosidase 1 increased pH in pure form or when associated to  $\alpha$  Amylase 1, but had no effect on pH when associated to  $\alpha$  Amylase 2 (Figure 1). Protease 1 increased silage pH only when added in pure form (Figure 1). A significant interaction between enzyme, type of hybrid, particle size, and duration of storage was detected for pH in experiment 2 (Table 3, Figure 2) and between enzyme and particle size and between enzyme and duration of storage in experiment 3 (Table 4, Figure 3). The combination of enzymes had distinct effect on silage pH compared to enzymes in single form and other factors of the ensiling process, such as particle size, duration of storage, and type of hybrid can determine the effect of enzymes on silage pH.

In experiments 2 and 3 (Tables 3 and 4), fine particles at ensiling and long duration of storage induced lower silage pH than coarse grinding and short storage (Figure 3). Although a statistically significant *P* - value in experiment 2 supported that silage of flint corn had higher pH than silage of floury corn, suggesting lowered fermentability of the vitreous endosperm or increased buffering of acids in the silo, the difference in silage pH between flint and floury corn was only 0.03 (Table 3). Fernandes (2014) observed no effect of the degree of endosperm hardness on silage pH when a flint and a floury corn were ground with a 12 mm mesh screen and ensiled as REC (2635  $\mu\text{m}$  GMPS) or HMC (2400  $\mu\text{m}$  GMPS). The pH evaluated at 7, 21, 60, and 120 d of ensiling showed that HMC induced a faster drop in pH and lower concentrations of ethanol and butyrate than REC.

### ***Silage Composition***

In experiment 1, enzymes affected the concentrations of DM, CP, and starch of REC (Table 2). The  $\alpha$  amylases did not change CP and starch concentration in silage, but induced small increase in silage DM content (+ 0.4 % units). Protease 1 reduced silage CP (- 0.5 % units) and increased the concentrations of starch (+ 1.2 % units) and DM (+ 0.5 % units). Fibrolytic reduced DM concentration (- 0.8 % units) and had no effect on the content of starch and CP. Amyloglucosidase 1 reduced silage starch concentration (- 6.7 % units). In experiment 2, the association of  $\alpha$  Amylase 3 and Protease 2 increased starch concentration (+ 2.9 % units) compared to the enzymes in pure form, but had no effect on DM and CP concentrations (Table 3). In experiment 3, Amyloglucosidase 2 reduced the concentration of DM in silage (- 1.8 % units) (Table 4). In general, the change in silage composition induced by enzymes was minor, except for the marked reduction in starch concentration induced by Amyloglucosidase 1.

In experiment 2, storing silage for 120 d increased DM concentration in comparison with storage for 30 d (+ 1.4 % units) and 90 d (+ 1.0 % units) (Table 3). A similar trend for a positive relationship between silage DM concentration and duration of storage was also observed for silages stored for 30 and 250 d in experiment 3 (+ 1.6 % units) (Table 4). The increase in silage DM concentration with elongated storage is not an expected outcome of silage fermentation (WOOLFORD, 1984). Corn was ensiled in vacuum-sealed bags in experiments 2 and 3 and loss of DM by effluent was not feasible. The oven-dried DM concentration represents the non-volatile DM in silage. The increase in DM concentration with longer duration of storage may be the result of dehydration or a decrease in the proportion of volatile DM in silage mass. By both mechanisms, it seems that the oxygen barrier film of the experimental silos was not completely impermeable to water and organic acids. However, the small magnitude of the response in DM concentration to duration of ensiling is in

agreement with the relatively constant DM concentration of REC ensiled for 7, 21, 60, and 120 d, as observed by Fernandes (2014). The DM concentration of REC ensiled for 250 d was relatively constant over time.

The concentration of starch was increased (+ 2.2 % units) and the concentration of CP was reduced (- 0.4 % units) with storage for 90 and 120 d compared to 30 d (Table 3), suggesting that the degradation of CP and other non-starchy substrates increased the proportion of starch in silage DM over time. Fernandes (2014) also observed increased starch concentration in REC than in the grain before ensiling. However, the response in silage starch and CP concentrations to the duration of storage interacted with the type of enzyme. Storage of corn for 120 d with  $\alpha$  Amylase 3 plus Protease 2 and with  $\alpha$  Amylase 3 in pure form increased starch concentration, but storage for 120 d with Protease 2 reduced the starch content (Figure 4). Corn ensiled with Protease 2 for 120 d had the lowest CP concentration and corn ensiled for 30 d with  $\alpha$  Amylase 3 had the highest CP concentration (Figure 4).

The silage of flint corn had + 1.9 % units of CP concentration than floury corn silage (Table 3), reasonably reflecting the greater CP concentration of the flint compared to the floury grain before ensiling (Table 1). Flint corn silage also had higher starch concentration than floury (+ 1.3 % units), suggesting a lower degree of starch breakdown during storage, what is consistent with its high pH (Table 3). Particle size had no effect on silage starch and CP concentrations in experiment 2 (Table 3). However, compared with fine grinding, coarse grinding tended ( $P = 0.07$ ) to increase silage DM concentration by + 0.5 % units in experiment 2 (Table 3) and to reduce DM concentration by - 1.2 % units in experiment 3 (Table 4). The change in DM concentration in response to the grinding procedure seemed to be of small biological significance. The DM concentration of whole corn kernels ensiled with 33 and 36 % moisture for 15, 30, and 90 d did not differ from the DM concentration of the same hybrid

ensiled after grinding through an 8 mm mesh screen (BARON; STEVENSON; BUCHANAN-SMITH, 1986).

### ***Dry Matter Loss***

Experiment 1 used plastic pipe mini-silos that allowed for a respiratory phase during the ensiling process, while the nylon-polyethylene vacuum-sealed bags of experiments 2 and 3 were theoretically anaerobic. The DM loss measured in experiment 1 represents loss by respiration and fermentation during ensiling and as silage effluent, distinctly of the DM loss of experiments 2 and 3, mostly fermentative. The mean DM loss in the plastic pipe mini-silos was 7.9 % of ensiled in experiment 1 (Table 2) and for the nylon-polyethylene vacuum-sealed bags it was 3.0 % in experiment 2 (Table 3) and 3.3 % in experiment 3 (Table 4). This data suggests that about 60 % of the DM loss in plastic pipe mini-silos occurred by effluent and aerobic breakdown of DM during the early stages of ensiling.

In experiment 1, Amyloglucosidase 1 and Fibrolytic increased DM loss during the 81-d storage period (Table 2). The increase in DM loss induced by Amyloglucosidase 1 was followed by a reduction in silage starch concentration, as already discussed, but Fibrolytic did not affect starch content. Similarly, Amyloglucosidase 2 almost doubled DM loss in comparison to Control in experiment 3 (Table 4), especially when added to coarsely ground corn (Figure 5). Amyloglucosidase 2 increased DM loss over the Control by + 3.8 % units when pure, + 1.3 % units when mixed with  $\alpha$  Amylase 1, and + 2.9 % units when mixed with  $\alpha$  Amylase 2 (Figure 6). The highest DM loss of all possible combinations of treatments was for Amyloglucosidase 2 in pure form (Figure 6). No effects of  $\alpha$  Amylases 1 and 2 and of Protease 1 on DM loss were detected in experiment 1 (Table 2). In experiment 2, the effect of  $\alpha$  Amylase 3 on DM loss did not differ from pure Protease 2 or the association of both enzymes (Table 3). The effect of Amyloglucosidase 2 on DM loss did not interact with the duration

of storage in experiment 3 (Table 4). This data suggests that the breakdown of the linear amylose chain was not enhanced by  $\alpha$  amylases, but amyloglucosidases, capable of degrading the  $\alpha$  1-6 linkages in amylopectin, increased substrate fermentation, since the vacuum-sealed mini-silos of experiment 2 were anaerobic and consequently did not have a significant respiratory phase.

In experiments 2 and 3, the DM loss was not affected by the duration of storage, suggesting that DM loss before 30 d of ensiling determined silage loss, and coarse grinding increased DM loss (Tables 3 and 4). Coarse grinding increased DM loss by + 0.05 % units in experiment 2 (Table 4), a non-meaningful biological difference, and by + 1.2 % units in experiment 3 (Table 4). The opportunity for improving the rate of grinding with coarse particle size did not significantly penalized feed recovery at silo unloading compared to fine grinding, when GMPS ranged from 1070 to 584  $\mu\text{m}$  (Table 1). In the experiment of Fernandes (2014), REC with larger GMPS than the values of this experiment had increased loss of DM with longer duration of storage, most of the loss occurred during the first 7 days of ensilaging and reached a plateau at 60 days. In that experiment, the loss of DM of REC was 6.6 % of ensiled and the DM loss of the same hybrids ensiled as HMC was 2.5 %. The effect of the duration of ensiling on DM loss of extremely coarse corn may deserve further evaluation. The coarse particle size evaluated in this experiment may have not been large enough to induce an undesirable effect of elongated storage on DM loss.

#### ***Ammonia-N and Prolamin***

Ammonia-N as a proportion of CP was used as an indirect measure of prolamin degradation in experiment 1 (HOFFMAN et al., 2011) and in experiments 2 and 3 silages were analyzed for prolamin content. In experiment 1, Protease 1 increased and  $\alpha$  Amylase 2 and Amyloglucosidase 1 reduced ammonia-N/CP in silage (Table 2). The increase in proteolytic activity induced

by Protease 1 and the supply of rapidly fermentable carbohydrates for microbial growth by the action of amylases are plausible explanations for the effect of these enzymes. The use ammonia-N accumulation as a measure of proteolysis in silage may need to consider the action of other factors affecting carbohydrate availability for microbial growth in the silo. In accordance with the observed increase in ammonia-N/CP in response to Protease 1, Protease 2 reduced silage prolamin concentration and prolamin as a proportion of CP in experiment 2 (Table 3). The possibility of reducing the prolamin concentration of REC silage with the addition of protease at ensiling has been demonstrated (FERRARETTO; FREDIN; SHAVER, 2015). Fine and coarse silage had similar prolamin content after ensiling (Tables 3 and 4). There was no evidence to suggest that the range of corn GMPS evaluated was a factor on the effect of ensilaging on prolamin degradation.

In experiment 2, REC of flint corn had higher prolamin concentration as proportions of DM and of starch than silage of floury corn, but prolamin as a proportion of CP was similar (Table 3). Prolamin protein represented 58 % of CP in REC silage. Ensilaging reduced the disparity in prolamin content between flint and floury grain compared to the disparity before ensiling (Table 1). In experiment 2, silage prolamin content and prolamin as a proportion of CP were reduced when storage was increased from 30 to 120 days (Table 3). Prolamin as a proportion of DM was also reduced when storage was elongated from 30 to 250 days in experiment 3 (Table 4). The data of Fernandes (2014) on prolamin concentration of coarsely ground REC over 120 days of ensiling shows that the reduction of prolamin as % of DM within 7 days of ensiling made a flint and a floury hybrid to have equal prolamin content at 21, 60, and 120 d of storage. However, ammonia-N/CP and soluble protein/CP increased with the duration of storage up to 120 days and were predictors of proteolysis over time. Prolamin

degradation occurred for more than 90 days of silage storage, as supported by experiment 2 (Table 3).

### ***Ruminal In Vitro Digestibility***

In experiment 1, the ruminal *in vitro* digestibility of DM and starch was evaluated by incubation of oven-dried and ground samples (1 mm mesh screen) for 3 and 7 hours with strained rumen fluid. The degradation of DM in 3 h responded the most to treatments (Table 2). Amyloglucosidase 1 induced the highest disappearance of DM and starch over control (+ 7.2 % units in DM Deg 3 and + 9.3 % units in Starch Deg 3). Fibrolytic induced minor increase (+ 1.1 % units) and  $\alpha$  Amylase 2 induced minor decrease (- 1.1 % units) in DM Deg 3. Distinctly from the 3 h incubation, there was no detectable treatment effect on the 7 h starch degradation (Table 2). The capacity of Amyloglucosidase 1 to alter the ruminal degradation of REC led us to explore this enzyme further. Samples of the seven silos that received only water (Control-Control) or only Amyloglucosidase 1 (Control- Amyloglucosidase 1) were incubated *in vitro* with an automated gas production system. Amyloglucosidase 1 increased the volume of gas accumulated in 3 h, slightly decreased gas volume up to 7 h ( $P = 0.12$ ), and had no effect on the 18 h gas volume (Table 5). Apparently, this enzyme was capable of increasing the fast degrading starch pool of REC. The increased degradation of starch in grain is a plausible explanation for the increased concentration of prolamin induced by Amyloglucosidase 1 (Table 5), and suggests that the action of amyloglucosidase on branched starch was of greater magnitude than the action of proteases on prolamins. Silage kd was reduced by Amyloglucosidase 1, but the increased proportion of rapidly degradable starch avoided a reduction in potential digestibility, described as cumulative gas volume.

The response in ruminal DM digestibility to Amyloglucosidase 2 in experiment 3 (Table 4) paralleled the response to Amyloglucosidase 1 in

experiment 1 (Tables 2 and 5). Amyloglucosidase 2 increased DM degradation in 3 h, tended to increase DM degradation in 7 h ( $P = 0.13$ ), and had no effect on the 18 h DM degradation. Fernandes et al. (2016) observed that rehydrated corn and sorghum ensiled with Amyloglucosidase 1 and Amyloglucosidase 2 had increased DM disappearance at time zero (Fraction A) than control, but the enzymes did not affect DM degradation at 3, 6, 12, 18, and 48 h of ruminal *in situ* incubation. The addition of amyloglucosidase to REC seems to be a tool to manipulate feed fermentability by increasing rapidly degradable starch pool size. Amyloglucosidase 1 also induced a greater positive response in DM Deg 3 over the Control when associated to  $\alpha$  Amylase 2 (Figure 8), suggesting that a blend of amylase and amyloglucosidase can have better action than the enzymes in single form. There was no detectable interaction between duration of storage and the action of the enzyme, silages ensiled for 30 and 250 d responded similarly to Amyloglucosidase 2 (Table 4). The particle size of the ensiled grain also did not determine the response in digestibility to Amyloglucosidase 2. Electron microscopy pictures showed that Amyloglucosidase 1 induced the occurrence of pores in starch granules of the endosperm (Figure 7).

Protease 1 had no effect on ruminal DM and starch degradation in 3 and 7 h in experiment 1 (Table 2). In experiment 2, DM Deg 3 and DM Deg 7 of silages added of Protease 2 were similar to the degradation of silages with  $\alpha$  Amylase 3, but Protease 2 increased DM Deg 18 when associated with  $\alpha$  Amylase 3, compared to the enzymes in single form (Table 7). The kd estimated with two (3 - 7 h, 3 - 18 h, and 7 - 18 h) and three (3 - 7 - 18 h) incubation residues were all increased by Protease 2 (Table 6). The *in vitro* gas accumulation data for the same treatments confirmed that Protease 2 associated to  $\alpha$  Amylase 3 increased the long term digestion of the silage (18 h), but had no effect on short term incubations (3 and 7 h) (Table 7). Protease tended to increase ( $P = 0.10$ ) the cumulative gas volume, but induced only a numerical

increase in kd and had no effect on Lag time. Ferraretto et al. (2015) also observed a positive effect of protease on the *in vitro* degradation of REC starch. The effect of enzymes on the degradation of corn DM in experiment 2 did not interact with silage particle size, hybrid type, or the duration of storage from 30 to 120 d (Tables 6 and 7), suggesting that the positive effect of the protease on silage digestibility was independent of other factors.

The effect of the duration of storage on silage digestibility was evaluated in experiments 2 and 3. In experiment 1, storage for 90 or 120 d induced greater DM degradation in 3, 7, and 18 h incubations compared with storage for 30 d, the same was observed for kd (Table 6). The gas accumulation data at 7 and 18 h suggests that storage of silage for 120 d induced greater digestibility than storage for 30 and 90 d (Table 7). The cumulative gas volume was increased by storage for 120 d, but no effect of the duration of storage was detected for the gas accumulated in 3 h, kd, and Lag time. The gain in digestibility induced by longer duration of ensiling in experiment 2 was greater than the gain induced by Protease 2, in accordance with the effects observed on silage prolamin content. Longer storage decreased silage prolamin content more than the addition of protease (Table 3).

This experiment evaluated the effect of particle size of the silage on the *in vitro* digestibility of the ground feed (1 mm mesh screen). There were trends of lower ruminal DM degradation at 7 ( $P = 0.10$ ) and 18 h ( $P = 0.12$ ) and for lower kd 3 -7 h ( $P = 0.09$ ) for coarse compared to finely ground corn (Table 6). The 18-h gas volume and the cumulative gas volume were increased by fine grinding, even at a lower kd than coarse grinding (Table 7). Fine particles at ensiling may have been more prone to the positive effect of ensiling on digestibility than coarse particles, although silage composition and prolamin concentration were not affected by particle size (Table 3).

The degree of corn hardness did not affect the *in vitro* digestibility in experiment 2 (Tables 6 and 7). Ensiling finely ground mature flint corn for at least 30 days resulted in similar digestibility to floury grain, in accordance to the observed by Fernandes (2014) with coarsely ground flint and floury corn. Andrade Filho et al. (2010b) showed that flint corn had greater proportional increase in digestibility in response to REC than floury corn.

The incubation *in situ* for 240 hours of two samples of finely ground mature flint corn generated this result: 99.13 and 98.64 % of DM was degraded in the rumen; 99.98 and 99.97 % of the starch was degraded in the rumen; and the concentration of starch in the incubated residue was 0.69 and 1.31 % of DM (data not shown). The amount of indigestible starch in corn grain seems to be negligible (no Fraction C), making the linear decay of the natural logarithm of the residue/incubated over time a measure of the  $k_d$  of the slowly degradable starch pool (Fraction B). By assuming that the 3-h degradation residue is a reasonable estimate of the instantaneously degradable starch pool (Fraction A), the effective ruminal degradation (ERD) could be calculated as:  $ERD = \text{Mass of Fraction A} + \text{Mass of Fraction B} * [k_d / (k_d + k_p)]$ , where  $k_p$  is the fractional passage rate of starch. Another approach to calculate ERD would be with a 1-pool model, the concept currently adopted by the Cornell Net Carbohydrate and Protein System:  $ERD = \text{Mass} * [k_d / (k_d + k_p)]$ . The estimated  $k_d$  of REC silage DM for a 2-pool model ranged from 2.2 to 4.3 %/h (mean 3.6) in experiment 1, and the estimate for a 1-pool model ranged from 18.3 to 22 %/h (mean 20.1). The fast degrading pool had *in vitro* degradation in 3-h incubation of 15.4, 13.5, and 15.3 % of DM in experiments 1, 2, and 3 (mean 14.7 % of DM). Starch degradation in 3 h was 16 % of starch in experiment 1, of similar magnitude to DM Deg 3. The estimated ERD of REC using a  $k_p$  of 7 %/h was 43.7 % of DM for the 2-pool model  $\{\text{DM Deg 3} + (100 - \text{DM Deg 3}) * [k_d / (k_d + k_p)]\}$  and 74.1 % of DM for the 1-pool model  $\{100 * [k_d / (k_d + k_p)]\}$ , a significant

difference in the prediction of ruminal starch digestibility. A recent measurement of the *in vivo* ruminal digestibility of starch in dairy cows (24.4 kg/d of milk, 18.9 kg/d DMI) fit with ruminal and duodenal cannula and fed 30 or 20% starch in diet DM ranged from 74 to 82 % of starch intake (NOZIÈRE et al., 2014).

## CONCLUSIONS

Rehydrated and ensiled corn showed to be a plausible strategy for grain storage. The silage pH and the DM loss during storage from 30 to 250 days was relatively constant. The pH was around 4 and the loss of silage DM was around 3 or 8 % of ensiled, depending on the experimental silo used. Vacuum-sealed plastic bags silos estimated lower DM loss than plastic pipe silos with Bunsen valves. The actual DM loss of REC in large-scale farm silos needs quantification to validate the mini-silo estimates. The loss of DM during silage storage increases the cost of unloaded feed. Understanding and manipulating the microbiology and fermentation profile of REC over the duration of storage is an avenue for reducing DM loss.

Within the range of GMPS evaluated, there was no evidence to suggest that corn particle size was a factor on the effect of ensilaging on prolamin degradation, but coarsely ground corn had a tendency to be less digestible *in vitro* than finely ground corn. The addition of amyloglucosidase and protease at ensiling showed to be potential tools for manipulating REC ruminal fermentation profile. Amyloglucosidase increased the fast degrading starch pool and reduced kd, with no effect on potential digestibility, but at the expense of increased DM loss during storage and lowered starch concentration in feed. Proteases increased prolamin degradation during storage and the potential ruminal *in vitro* degradation when associated to  $\alpha$  amylase, without increasing

the rapidly fermentable starch pool. Longer storage increased digestibility and decreased prolamin more than the addition of protease. Grain hardness did not affect REC digestibility.

## REFERENCES

- ÅKERBERG, C. et al. A kinetic model for enzymatic wheat starch saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 75, n. 4, p. 306–314, 2000.
- ANDRADE FILHO, R. et al. Degradabilidade ruminal in situ de grãos de milho maduros do tipo flint ou dentado, secos ou reconstituídos e ensilados. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010a. 1 CD-ROM.
- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and in situ starch degradability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 60, 2016.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 2nd ed. Washington, 1975.
- AVILA, C. L. S. et al. Bacteriological profile of sorghum and corn grain rehydrated silages with the use of enzymes. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: [s. n.], 2015.
- BACH, A.; IGLESIAS, C.; DEVANT, M. Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 136, n. 1–2, p. 146–153, July 2007.
- BARON, V. S.; STEVENSON, K. R.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of corn-grain ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 66, p. 451–461, 1986.
- BITENCOURT, L. L. **Substituição de milho moido por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2012.

BRENDA the comprehensive enzyme informatio system. Disponível em: <<http://www.brenda-enzymes.org>>. Acesso em: 12 jun. 2016.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Hoboken: J. Wiley, 2000.

BURROUGHS, W. et al. Enzyme addition to fattening cattle rations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 19, p. 458–464, 1960.

CALIFORNIA PELLET MILL, C. **No title**. Disponível em: <<http://www.cpm.net/downloads/Advantages and Disadvantages of Particle Size Reduction Techniques.pdf>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

CARVALHO, P. A. et al. Shifts on bacterial population of high moisture corn silages and its correlation with fermentation end-products. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2015. 1 CD-ROM.

CHANEY, A. L.; MARBACH, E. P. Modified Reagents for Determination of Urea and Ammonia. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 8, n. 2, p. 130–132, 1962.

CORONA, L.; OWENS, F. N.; ZINN, R. A. Impact of corn vitreousness and processing on site and extent of digestion by feedlot cattle. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 3020–3031, 2006.

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

COSTA, F. M. J. et al. Silagem de grãos úmidos de milho de textura dura ou macia em dietas com polpa cítrica para vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, p. 203–210, 2014.

DAVIDE, L. M. C.; RAMALHO, M. A. P. Assessment of genetic parameters of degradability in maize grains due to indentation scores. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 11, p. 10–16, 2011.

DEFRAIN, J. M. et al. Effects of dietary alpha-amylase on metabolism and performance of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 12, p. 4405–4413, 2005.

DOMBRINK-KURTZMAN, M. A.; BIETZ, J. A. Zein composition in hard and soft endosperm of maize. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 70, p. 105–108, 1993.

FERNANDES, J. **Influência de genótipo , maturidade e tempo de armazenamento na qualidade de silagens de grãos de milho com alta umidade**. Piracicaba: Universidade de São Paulo; Escola Superior de Agricultura “ Luiz de Queiroz ”, 2014.

FERNANDES, T. et al. Effect of glucoamylase and duration of silage storage on ruminal degradation and dry matter loss of corn and shorghum grain rehydrated and ensiled. In: JOINT ANNUAL MEETING , 1., 2016, Salt Lake. **Anais...**Salt Lake: ASAS, 2016.

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

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of corn silage hybrids differing in starch and neutral detergent fiber digestibility on lactation performance and total-tract nutrient digestibility by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 1, p. 395–405, 2015.

FERRARETTO, L. F. et al. Effect of feeding a reduced-starch diet with or without amylase addition on lactation performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 3, p. 1490–1499, 2011.

FERRARETTO, L. F. et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 5, p. 3221–7, 2014.

FERRARETTO, L. F.; FREDIN, S. M.; SHAVER, R. D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 12, p. 7318–7327, 2015.

FIRKINS, J. L. et al. Effects of grain variability and processing on starch utilization by lactating dairy cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, p. 218–238, 2001. Suppl.

FREDIN, S. M. et al. Effects of corn-based diet starch content and corn particle size on lactation performance , digestibility , and bacterial protein flow in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 98, n. 1, p. 541–553, 2015.

FREER, S. N. Purification and characterization of the extracellular alpha-amylase from *Streptococcus bovis* JB1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1398–1402, 1993.

FREY, P. A.; HEGEMAN, A. D. **Enzymatic reaction mechanisms**. 2nd ed. New York: Oxford, 2007.

GIUBERTI, G. et al. Evaluation of the impact of maize endosperm vitreousness on in vitro starch digestion, dry matter digestibility and fermentation characteristics for pigs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 186, n. 1/2, p. 71–80, 2013.

GIUBERTI, G. et al. Factors affecting starch utilization in large animal food production system : a review. **Starch Journal**, Weinheim, v. 66, p. 72–90, 2014.

GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. A comparison of methods to quantify prolamin protein contents in cereals. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 10, p. 7–13, 2011.

GIUBERTI, G.; GALLO, A.; MASOERO, F. Quantification of zeins from corn, high-moisture corn, and corn silage using a turbidimetric method: Comparative efficiencies of isopropyl and tert-butyl alcohols. **Journal of Dairy Science**, Champaign, n. 95, p. 3384–3389, 2012.

GOODRICH, R. D.; BYERS, F. M.; MEISKE, J. C. Influence of moisture content, processing and reconstitution on the fermentation of corn grain. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 41, n. 3, p. 876–881, 1975.

GUERRA, N. P.; PASTRANA CASTRO, L. **Modelling the effects of ageing time of starch on the enzymatic activity of three amylolytic enzymes**. 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/402439/>>. Acesso em: 23 jun. 2016.

GUPTA, R. et al. Microbial alpha-amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1599–1616, 2003.

GUTIÉRREZ, C. et al. Effect of exogenous amylase or glucoamylase dose on in

situ ruminal digestion of corn and sorghum. **Journal of Applied Animal Research**, Izatnagar, v. 27, n. 1, p. 7–10, 2005.

HALL, M. B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. **Journal of AOAC International**, Arlington, v. 92, n. 1, p. 42–9, 2009.

HAMAKER, B. R. et al. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 72, p. 583–588, 1995.

HARMON, D. L.; YAMKA, R. M.; ELAM, N. A. Factors affecting intestinal starch digestion in ruminants: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 84, p. 309–318, 2004.

HARRELSON, F. W. et al. Influence of corn hybrid and processing method on nutrient digestibility, finishing performance, and carcass characteristics. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 7, p. 2323–2332, 2009.

HENDERSON, A. R.; MCDONALD, P.; ANDERSON, D. The effect of a cellulose preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during the ensilage of grass, lucerne and clover. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 33, p. 16–19, 1982.

HENDERSON, A. R.; MCDONALD, P. The effect of cellulase preparations on the chemical changes during the ensilage of grass in laboratory silos. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v. 28, p. 486–488, 1977.

HERON, S. J. E.; EDWARDS, R. A.; MCDONALD, P. Changes in the nitrogenous components of gamma-irradiated and inoculated ensiled ryegrass. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, n. 37, p. 979–985, 1986.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997.

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, 2012.

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

HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. **A Guide to understanding vitreousness and prolamins in corn**. Disponível em: <[https://shaverlab.dysci.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/87/2015/04/FGES-ProlaminGuidev2.0\\_000.pdf](https://shaverlab.dysci.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/87/2015/04/FGES-ProlaminGuidev2.0_000.pdf)>. Acesso em: 12 jun. 2016.

HOLDING, D. R. Recent advances in the study of prolamin storage protein organization and function. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 5, p. 276, 2014.

HUNTINGTON, G. B.; HARMON, D. L.; RICHARDS, C. J. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 14–24, 2006. Suppl.

KAMRA, D. N. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*, Bangalore, v. 89, n. 1, p. 125–135, July 2005.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 27, n. 15, p. 137, 1965.

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

KONSULA, Z.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M. Hydrolysis of starches by the action of an alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, London, v. 39, p. 1745–1749, 2004.

KUNG, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 3, p. 1707–1712, Mar. 2014.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Improved method for amino nitrogen as nonprotein, true proteins, salt-soluble proteins, zeins and true glutelins in maize endosperm. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 77, p. 620–626, 2002.

LANDRY, J.; DELHAYE, S.; DAMERVAL, C. Protein distribution pattern in floury and vitreous endosperm of maize grain. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 81, n. 2, p. 153–158, 2004.

LARSON, J.; HOFFMAN, P. C. Technical note: a method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 4834–4839, Dec. 2008.

MCALLISTER, T. A. et al. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms <sup>1</sup>. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 205–212, 1993.

MCALLISTER, T. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Wallingford, USA: CAB international, 2001. p. 273–298.

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

MCHOVIC, M.; JANECEK, S. Amylolytic enzymes: types, structures and specificities. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (Ed.). **Industrial enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 3–19.

MCLAREN, R. J.; MATSUSHIMA, K. Digestion of ensiled reconstituted corn. **Journal of Dairy Science**, v. 27, p. 1171, 1968.

MENDES, I. A. P. **Consumo, digestibilidade, produção e composição do leite de vacas alimentadas com silagem e grão de milho moído reidratado substituindo milho seco moído do concentrado**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

MOHARRERY, A.; LARSEN, M.; WEISBJERG, M. R. Starch digestion in the rumen, small intestine, and hind gut of dairy cows: a meta-analysis. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 192, p. 1–14, 2014.

MORAIS, G. et al. A review on additives for grain silages. In: INTERNATIONAL CONFERENCE FORAGE CONSERVATION, 17., 2016, High Tatras. **Proceedings...** High Tatras: NAFC, 2016. 1 CD-ROM.

MOTTA, V. T. **Bioquímica básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2011.

- MORAIS, G. et al. Effects of chemical and microbial additives on the fermentation and aerobic stability of rehydrated corn grain silages. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 17., 2015, Piracicaba. **Proceedings...** Piracicaba: USP, 2015. 1 CD-ROM.
- NAJAFI, M. F.; DEOBAGKAR, D. Purification and characterization of an extracellular  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis* AX20. **Protein Expression and Purification**, Madison, v. 41, p. 349–354, 2005.
- NELLIS, S. E.; HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. Technical note: a modified method to quantify prolamin proteins in dry and high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 96, n. 7, p. 4647–52, 2013.
- NGONYAMO-MAJEE, D. et al. Relationships between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn germplasm. II. Ruminant and post-ruminant degradabilities. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 142, n. 3–4, p. 259–274, 2008.
- NOZIÈRE, P. et al. Amylase addition increases starch ruminal digestion in first-lactation cows fed high and low starch diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 4, p. 2319–2328, 2014.
- OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 184–194, 2003.
- OWENS, F. N. **Impact of grain processing and quality on holstein steer performance**. Disponível em: <<http://www.extension.umn.edu/agriculture/dairy/beef/impact-of-grain-processing-and-quality.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- PAES, M. C. D. **Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 6 p. (Circular Técnica, 75).
- PEREIRA, M. N.; BARBOSA, E. F.; PEREIRA, R. A. N. Relationship between total tract starch digestibility and fecal starch content in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 2, p. 360, 2015. Suppl.
- PEREIRA, M. N. et al. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain

at three maturity stages. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, p. 358–363, Aug. 2004.

PEREIRA, M. N. et al. Silagem de milho reidratado na alimentação do gado leiteiro. **Informe Agropecuário Epamig**, Belo Horizonte, v. 37, p. 7–18, 2013.

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

PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 68, n. 1–2, p. 25–35, 1997.

PLANCHOT, V. et al. Extensive degradation of native starch granules by alpha-amylase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Cereal Science**, London, v. 21, p. 163–171, 1995.

PLAZA, L. et al. Influence of environmental conditions on thermal stability of recombinant *Aspergillus aculeatus* pectinmethylesterase. **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 912–920, 2008.

RAUSCH, K. D. et al. Particle size distributions of ground corn and ddgs from dry grind processing. **Transactions of the American Society of Agricultural Engineers**, Saint Joseph, v. 48, n. 1, p. 273–277, 2005.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. An introduction to peptidases and the merops database. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. (Ed.). **Industrial Enzymes**. Dordrecht: Springer, 2007. p. 161–180.

RÉMOND, D. et al. Effect of corn particle size on site and extent of starch digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1389–1399, 2004.

REZENDE, A. V. et al. Rehydration of corn grain with acid whey improves the silage quality. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 197, p. 213–221, 2014.

RODRIGUES, D. E. et al. **Avaliação do desempenho do desintegrador/**

**picador /moedor (DPM) na moagem do milho.** Viçosa, MG, Universidade Federal de Viçosa, 2000.

SALEM, A. Z. M. et al. Effect of glucoamylase enzyme extract on in vitro gas production and degradability of two diets with 25% of corn or sorghum grains. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 85, n. 2, p. 183–188, 2015.

SCHAEFER, D. M. et al. Inoculation of corn silage and high-moisture corn with lactic acid bacteria and its effects on the subsequent fermentations and on feedlot performance of beef steers. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 25, p. 23–38, 1989.

SIMPSON, D. J. Proteolytic degradation of cereal prolamins: the problem with proline. **Plant Science**, Limerick, v. 161, n. 5, p. 825–838, 2001.

SINGH, H.; SONI, S. K. Production of starch-gel digesting amyloglucosidase by *Aspergillus oryzae* HS-3 in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 37, p. 453–459, 2001.

SIVARAMAKRISHNAN, S. et al. alpha-amylases from microbial sources - An overview on recent developments. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 44, n. 2, p. 173–184, 2006.

SUJANI, S.; SERESINHE, R. T. Exogenous Enzymes in Ruminant Nutrition: a Review. **Asian Journal of Animal Sciences**, Dubai, v. 9, n. 3, p. 85–99, 2015.

TAYLOR, C. C.; ALLEN, M. S. Corn grain endosperm type and brown midrib 3 corn silage: site of digestion and ruminal digestion kinetics in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 4, p. 1413–1424, 2005.

TAYLOR, K. B. **Enzyme Kinetics and Mechanisms**. Dordrecht: Springer, 2002.

TILLEY, J. M. A.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. **Grass and Forage Science**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 104–111, June 1963.

TRICARICO, J. M.; JOHNSTON, J. D.; DAWSON, K. A. The potential of supplemental enzymes in dairy and feedlot diets : fungal amylaseAlltech's. In: ANNUAL SYMPOSIUM, 18., 2002, Nottingham. **Proceedings...** Nottingham: Nutritional Biotechnonology in the Feed and Food Industries, 2002. 1 CD-ROM.

UGURU, G. C. et al. Purification, characterization and mutagenic enhancement of a thermoactive alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. **Journal Industry Microbiology and Biotechnology**, Cham, v. 19, p. 273–279, 1997.

VARGAS-RODRIGUEZ, C. F. et al. Effects of dietary amylase and sucrose on productivity of cows fed low-starch diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 7, p. 4464–70, 2014.

WEISS, W. P.; STEINBERG, W.; ENGSTROM, M. A. Milk production and nutrient digestibility by dairy cows when fed exogenous amylase with coarsely ground dry corn. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 5, p. 2492–2499, 2011.

WINDLE, M. C.; WALKER, N.; KUNG JÚNIOR, L. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 97, n. 5, p. 3053–3060, 2014.

WOOLFORD, M. K. **The silage fermentation**. New York: M. Dekker, 1984.

YOUNG, K. M. et al. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 11, p. 6687–6694, 2012.

ZHANG, B.; DHITAL, S.; GIDLEY, M. J. Synergistic and antagonistic effects of  $\alpha$  - amylase and amyloglucosidase on starch digestion. **Biomacromolecules**, Washington, v. 14, p. 1945–1954, 2013.

## ANEXOS

Table 1. Nutrient composition and particle size of ground corn grain before ensiling in experiments 1, 2, and 3.

	Experiment 1	Experiments 2 and 3			
	Flint	Floury <sup>1</sup>		Flint	
Hybrid					
DM, % of as fed	86.2	87.7		89.3	
CP, % of DM	11.0	8.9		10.6	
NDF, % of DM	9.8	9.2		9.3	
Starch, % of DM	68.7	73.4		71.3	
EE, % of DM		3.7		6.1	
Ash, % of DM		1.2		1.5	
Vitreousness, % of endosperm	72.1	49.2		77.5	
Prolamin, % of DM		3.1		6.1	
Prolamin, % of starch		4.4		8.6	
Prolamin, % of CP		34.4		57.5	
Geometrical mean particle size, $\mu\text{m}$	893	Fine 584	Coarse 844	Fine 657	Coarse 1070
% retained on sieve					
2360 $\mu\text{m}$	15.9	0.2	9.9	0.4	9.7
2000 $\mu\text{m}$	1.2	0.5	10.6	1.1	13.0
1180 $\mu\text{m}$	18.3	2.2	14.4	3.8	16.5
850 $\mu\text{m}$	19.8	21.3	21.8	28.2	30.8
425 $\mu\text{m}$	18.6	57.9	24.8	52.6	23.0
300 $\mu\text{m}$	10.0	4.7	3.9	5.2	2.1
Bottom pan	16.2	13.1	14.5	8.6	4.8
Surface area, $\text{cm}^2/\text{g}$	33.7	37.3	35.4	35.6	30.4

<sup>1</sup>Experiments 2 and 3 used the same floury hybrid and grinding procedures

Table 2. Rehydrated corn grain silage pH, DM, starch, and crude protein concentrations, ammonia-N, DM loss during ensiling and the *in vitro* degradation of DM and starch in 3 and 7 h of incubation as affected by a factorial arrangement of Factor 1 (Control,  $\alpha$  Amylase 1,  $\alpha$  Amylase 2) and Factor 2 (Control, Amyloglucosidase 1, Protease 1, Fibrolytic). Experiment 1 (N = 84).

	pH	DM % of as fed	Starch % of DM	CP % of DM	Ammonia-N % of CP	DM loss % of ensiled	DM Deg 3	DM Deg 7	Starch Deg 3	Starch Deg 7
							% of incubated			
Factor 1 <sup>1</sup>										
Control	3.83 <sup>b</sup>	66.4 <sup>b</sup>	75.5	10.5	4.9 <sup>a</sup>	8.0	15.7 <sup>a</sup>	31.5	16.5	31.9
$\alpha$ Amylase 1	3.83 <sup>b</sup>	66.6 <sup>ab</sup>	75.3	10.8	4.5 <sup>a</sup>	8.0	16.0 <sup>a</sup>	31.5	15.5	31.1
$\alpha$ Amylase 2	3.92 <sup>a</sup>	66.8 <sup>a</sup>	76.7	10.7	3.8 <sup>b</sup>	7.6	14.6 <sup>b</sup>	31.5	14.2	30.1
SEM	0.010	0.47	0.80	0.10	0.21	0.21	0.33	0.71	1.38	1.57
Factor 2 <sup>1</sup>										
Control	3.81 <sup>c</sup>	66.7 <sup>b</sup>	76.8 <sup>b</sup>	10.7 <sup>ab</sup>	4.6 <sup>a</sup>	6.7 <sup>b</sup>	13.3 <sup>c</sup>	32.2 <sup>ab</sup>	12.4 <sup>b</sup>	30.2
Amyloglucosidase 1	3.98 <sup>a</sup>	66.5 <sup>b</sup>	70.1 <sup>c</sup>	11.0 <sup>a</sup>	3.5 <sup>b</sup>	9.4 <sup>a</sup>	20.5 <sup>a</sup>	33.0 <sup>a</sup>	21.7 <sup>a</sup>	33.6
Protease 1	3.87 <sup>b</sup>	67.2 <sup>a</sup>	78.0 <sup>a</sup>	10.2 <sup>c</sup>	5.0 <sup>c</sup>	6.2 <sup>b</sup>	13.7 <sup>bc</sup>	30.1 <sup>b</sup>	14.5 <sup>b</sup>	30.4
Fibrolytic	3.77 <sup>d</sup>	65.9 <sup>c</sup>	76.4 <sup>b</sup>	10.6 <sup>b</sup>	4.5 <sup>a</sup>	9.2 <sup>a</sup>	14.4 <sup>b</sup>	30.7 <sup>b</sup>	13.0 <sup>b</sup>	30.0
SEM	0.012	0.12	0.92	0.12	0.25	0.24	0.38	0.82	1.63	1.86
<i>P</i> -value for main effects and interaction										
Factor 1	< 0.01	0.07	0.39	0.12	< 0.01	0.22	< 0.01	0.99	0.52	0.74
Factor 2	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.06	< 0.01	0.45
Interaction F1*F2	< 0.01	0.35	0.76	0.24	0.14	< 0.01	< 0.01	0.50	0.82	0.99

<sup>1</sup>Means with different superscript differ at  $P < 0.05$  (Pairwise t-test)

Table 3. Rehydrated corn grain silage pH, DM concentration, DM loss during ensiling, and composition as affected by the factorial arrangement of hybrid type (H. Flory, Flint), particle size (PS. Fine, Coarse), enzyme addition (E.  $\alpha$  Amylase 3, Protease 2,  $\alpha$  Amylase 3 + Protease 2), and duration of ensilage (D. 30, 90, 120 d). Experiment 2 (N = 180).

		pH	DM % of as fed	DM loss % of ensiled	Starch % of DM	CP % of DM	Prolamin % of DM	Prolamin % of starch	Prolamin % of CP
Hybrid	Floury	4.01	70.7	2.96	66.6	7.6	4.3	6.4	56.4
	Flint	4.04	70.6	3.01	67.9	9.5	5.6	8.6	59.4
	SEM	0.004	0.15	0.019	0.44	0.09	0.18	0.28	2.21
Particle size	Fine	3.98	70.4	2.96	65.7	8.5	4.9	7.5	57.8
	Coarse	4.07	70.8	3.01	65.8	8.6	5.0	7.6	58.0
	SEM	0.004	0.15	0.019	0.44	0.09	0.18	0.27	2.3
Enzyme <sup>1</sup>	$\alpha$ Amylase 3 (A)	4.00 <sup>b</sup>	70.6	2.99	64.3 <sup>b</sup>	8.6	5.3 <sup>a</sup>	8.3 <sup>a</sup>	62.2 <sup>a</sup>
	Protease 2 (P)	4.07 <sup>a</sup>	70.7	2.97	65.3 <sup>b</sup>	8.6	4.5 <sup>b</sup>	6.9 <sup>b</sup>	52.8 <sup>b</sup>
	A + P	3.99 <sup>b</sup>	70.6	2.99	67.7 <sup>a</sup>	8.5	5.0 <sup>ab</sup>	7.4 <sup>b</sup>	58.7 <sup>ab</sup>
	SEM	0.006	0.06	0.023	0.54	0.11	0.22	0.33	2.73
Duration <sup>1</sup>	30 d	4.14 <sup>a</sup>	70.0 <sup>b</sup>	3.00	64.5 <sup>b</sup>	8.8 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>	8.6 <sup>a</sup>	67.3 <sup>a</sup>
	90 d	3.87 <sup>c</sup>	70.4 <sup>b</sup>	2.99	66.0 <sup>a</sup>	8.5 <sup>b</sup>	5.1 <sup>b</sup>	7.9 <sup>a</sup>	58.2 <sup>b</sup>
	120 d	4.04 <sup>b</sup>	71.4 <sup>a</sup>	2.96	66.7 <sup>a</sup>	8.4 <sup>b</sup>	4.0 <sup>c</sup>	6.1 <sup>b</sup>	48.2 <sup>c</sup>
	SEM	0.006	0.19	0.023	0.54	0.11	0.22	0.34	2.78
<i>P</i> -value for main effects and interactions <sup>2</sup>									
Hybrid		< 0.01	0.61	0.07	0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.36
Particle Size		< 0.01	0.07	0.04	0.60	0.23	0.68	0.76	0.94
Enzyme		< 0.01	0.87	0.46	< 0.01	0.95	0.03	0.01	0.05
Duration		< 0.01	< 0.01	0.67	0.01	0.04	< 0.01	< 0.01	< 0.01
H × OS		< 0.01	0.36	0.88	0.24	0.16	0.85	0.96	0.55
H × E		< 0.01	0.25	0.67	0.81	0.19	0.80	0.81	0.74
H × D		0.46	0.11	0.52	0.79	0.82	0.26	0.20	0.49
PS × E		< 0.01	0.52	0.43	0.38	0.64	0.45	0.48	0.50
PS × D		< 0.01	0.48	0.17	0.22	0.56	0.55	0.65	0.56
E × D		< 0.01	0.29	0.50	< 0.01	< 0.01	0.24	0.70	0.71
H × PS × E		< 0.01	0.28	0.10	0.15	0.32	0.51	0.69	0.73
H × PS × E × D		0.04	0.43	0.60	0.94	0.14	0.88	0.85	0.84

<sup>1</sup>Means with different superscript differ at  $P < 0.05$  (Pairwise t-test)

<sup>2</sup> $P > 0.15$  for the interactions H x PS x D, PS x E x D, and H x E x D.

Table 4. Rehydrated corn grain silage, pH, DM concentration, DM loss during ensiling, prolamin, and the *in vitro* degradation of DM in 3, 7, and 18 h of incubation (Deg) as affected by the factorial arrangement of enzyme addition (E. Control, Amyloglucosidase 2), particle size (PS. Fine, Coarse), and duration of ensilage (D. 30, 240 d). Experiment 3 (N = 40).

		pH	DM	DM loss	Prolamin	Deg 3	Deg 7	Deg 18
			% of as fed	% of ensiled	% of DM			
Enzyme	Control	4.45	69.9	2.3	3.97	14.0	26.4	55.4
	Amyloglucosidase 2	4.09	68.1	4.4	4.04	16.6	30.6	56.3
Particle size	Fine	4.09	69.6	2.7	4.00	16.4	28.5	57.1
	Coarse	4.46	68.4	3.9	3.99	17.1	28.5	54.6
Duration	30 d	4.37	68.2	3.2	4.26	16.3	26.9	50.5
	250 d	4.18	69.8	3.4	3.73	17.3	30.1	61.1
SEM		0.017	0.13	0.19	0.127	0.02	0.02	0.02
<i>P</i> -value for main effects and interactions <sup>2</sup>								
Enzyme		< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.76	0.01	0.13	0.76
Particle size		< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.87	0.74	0.99	0.36
Duration		< 0.01	< 0.01	0.44	< 0.01	0.65	0.25	< 0.01
E x PS		< 0.01	0.42	< 0.01	0.09	0.27	0.36	0.48
E x D		< 0.01	0.83	0.68	0.73	0.56	0.66	0.50
PS x D		0.12	0.31	0.18	0.38	0.70	0.92	0.69
E x PS x D		0.32	0.29	0.30	0.62	0.64	0.56	0.74

<sup>2</sup>*P* > 0.15 for the interactions PS x D and E x PS x D

Table 5. Rehydrated corn grain silage pH, DM, starch, and crude protein concentrations, ammonia-N, DM loss during ensiling, the *in vitro* degradation of DM and starch in 3 and 7 h of incubation and evaluated with a gas system, and prolamins on treatments Control and Amyloglucosidase 1. Experiment 1 (N = 14 silos).

	Control	Amyloglucosidase 1	SEM	P-value
pH	3.78	3.96	0.01	< 0.01
DM, % of as fed	66.0	66.0	0.18	0.99
Starch, % of DM	76.0	68.6	1.71	0.02
CP, % of DM	10.8	10.9	0.20	0.58
Ammonia-N, % of CP	5.9	3.8	0.34	< 0.01
DM loss, % of ensiled	7.3	11.0	0.31	< 0.01
DM Deg 3, % of incubated	14.1	21.0	0.33	< 0.01
DM Deg 7, % of incubated	32.0	33.5	1.14	0.39
Starch Deg 3, % of incubated	12.3	24.8	1.48	0.01
Starch Deg 7, % of incubated	30.5	34.7	3.51	0.43
3-h gas volume, mL	32.6	36.3	49.14	0.04
7-h gas volume, mL	89.7	84.2	4.23	0.12
18-h gas volume, mL	183.4	175.9	4.70	0.52
Cumulative gas volume, mL	199.4	202.5	33.63	0.82
Fractional degradation rate, %/h	20.7	16.9	0.01	< 0.01
Lag, h	0.99	0.23	2.07	0.03
Prolamin, % of DM	2.7	5.5	0.24	< 0.01
Prolamin, % of starch	7.0	15.8	0.67	< 0.01
Prolamin, % of CP	25.5	51.0	2.24	< 0.01

Table 6. Rehydrated corn grain silage *in vitro* DM degradation in 3, 7, and 18 h of incubation and the fractional rate of degradation (kd) as affected by the factorial arrangement of hybrid type (H. Flory, Flint), particle size (PS. Fine, Coarse), enzyme addition (E.  $\alpha$  Amylase 3, Protease 2,  $\alpha$  Amylase 3 + Protease 2), and duration of ensilage (D. 30, 90, 120 d). Experiment 2 (N = 180).

		DM Deg 3	DM Deg 7	DM Deg 18	kd 3-7 h	kd 3-18 h	kd 7-18 h	kd 3-7-18 h
		% of DM			% /h			
Hybrid	Floury	14.2	24.1	48.2	3.51	3.69	3.76	3.71
	Flint	12.8	23.7	47.7	3.18	3.43	3.51	3.44
	SEM	0.62	0.95	0.97	0.223	0.145	0.184	0.152
Particle size	Fine	13.9	25.1	49.0	3.61	3.65	3.67	3.66
	Coarse	13.0	22.8	46.8	3.08	3.47	3.61	3.49
	SEM	0.62	0.96	0.97	0.222	0.146	0.184	0.151
Enzyme <sup>1</sup>	$\alpha$ Amylase 3 (A)	13.6	22.8	45.1 <sup>b</sup>	2.87 <sup>b</sup>	3.08 <sup>b</sup>	3.16 <sup>b</sup>	3.10 <sup>b</sup>
	Protease 2 (P)	12.7	23.6	48.5 <sup>a</sup>	3.49 <sup>ab</sup>	3.68 <sup>a</sup>	3.75 <sup>a</sup>	3.69 <sup>a</sup>
	A + P	14.1	25.3	50.2 <sup>a</sup>	3.68 <sup>a</sup>	3.92 <sup>a</sup>	4.01 <sup>a</sup>	3.94 <sup>a</sup>
	SEM	0.76	1.16	1.22	0.276	0.002	0.228	0.188
Duration <sup>1</sup>	30 d	12.3 <sup>a</sup>	19.5 <sup>b</sup>	36.3 <sup>b</sup>	2.16 <sup>c</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.16 <sup>b</sup>	2.16 <sup>b</sup>
	90 d	15.6 <sup>b</sup>	25.4 <sup>a</sup>	54.7 <sup>a</sup>	3.23 <sup>b</sup>	4.21 <sup>a</sup>	4.56 <sup>a</sup>	4.28 <sup>a</sup>
	120 d	12.6 <sup>a</sup>	26.9 <sup>a</sup>	52.7 <sup>a</sup>	4.64 <sup>a</sup>	4.32 <sup>a</sup>	4.20 <sup>a</sup>	4.29 <sup>a</sup>
	SEM	0.75	1.16	1.22	0.275	0.180	0.223	0.187
					<i>P</i> -value for main effects <sup>2</sup>			
Hybrid		0.12	0.80	0.73	0.29	0.19	0.35	0.22
Particle Size		0.27	0.10	0.12	0.09	0.37	0.82	0.46
Enzyme		0.42	0.30	0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Duration		< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.09	< 0.01	0.03	0.01

<sup>1</sup>Means with different superscript differ at  $P < 0.05$  (Pairwise t-test)

<sup>2</sup> $P > 0.15$  for all 2-term, 3-term, and the 4-term interactions.

Table 7. Rehydrated corn grain silage *in vitro* DM degradation evaluated with a gas system as affected by the factorial arrangement of hybrid type (H. Flory, Flint), particle size (PS. Fine, Coarse), enzyme addition (E.  $\alpha$  Amylase 3, Protease 2,  $\alpha$  Amylase 3 + Protease 2), and duration of ensilage (D. 30, 90, 120 d). Experiment 2 (N = 180).

		3-h gas volume	7-h gas volume	18-h gas volume	Cumulative gas volume	Fractional degradation rate	Lag	
		mL				%/h	h	
Hybrid	Flory	20.7	62.1	157.4	185.7	19.4	2.0	
	Flint	19.3	59.8	156.5	181.4	20.8	2.2	
	SEM	5.19	5.56	6.93	8.90	1.13	0.37	
Particle size	Fine	23.8	65.2	167.7	198.1	18.3	1.9	
	Coarse	16.2	56.7	146.1	169.0	22.0	2.4	
	SEM	5.19	6.02	7.49	8.90	1.23	0.37	
Enzyme	$\alpha$ Amylase 3 (A)	20.3	59.4	145.6 <sup>b</sup>	172.8	19.0	1.7	
	Protease 2 (P)	14.3	53.1	149.8 <sup>b</sup>	174.4	21.9	2.7	
	A + P	25.4	70.4	175.3 <sup>a</sup>	203.5	19.4	1.9	
	SEM	6.51	7.34	8.68	11.88	1.40	0.51	
Duration	30 d	13.2	47.8 <sup>b</sup>	139.4 <sup>b</sup>	168.0 <sup>b</sup>	19.3	2.7	
	90 d	17.0	56.6 <sup>b</sup>	140.4 <sup>b</sup>	160.1 <sup>b</sup>	21.0	2.0	
	120 d	29.8	78.5 <sup>a</sup>	191.0 <sup>a</sup>	222.5 <sup>a</sup>	19.5	1.7	
	SEM	6.33	6.97	9.36	12.02	1.38	0.46	
		<i>P</i> -value for main effects <sup>2</sup>						
Hybrid		0.86	0.78	0.93	0.74	0.42	0.67	
Particle Size		0.33	0.30	0.04	0.03	0.03	0.42	
Enzyme		0.48	0.21	0.04	0.10	0.31	0.32	
Duration		0.18	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.55	0.27	

<sup>1</sup>Means with different superscript differ at  $P < 0.05$  (Pairwise t-test)

<sup>2</sup> $P > 0.15$  for all 2-term, 3-term, and the 4-term interactions

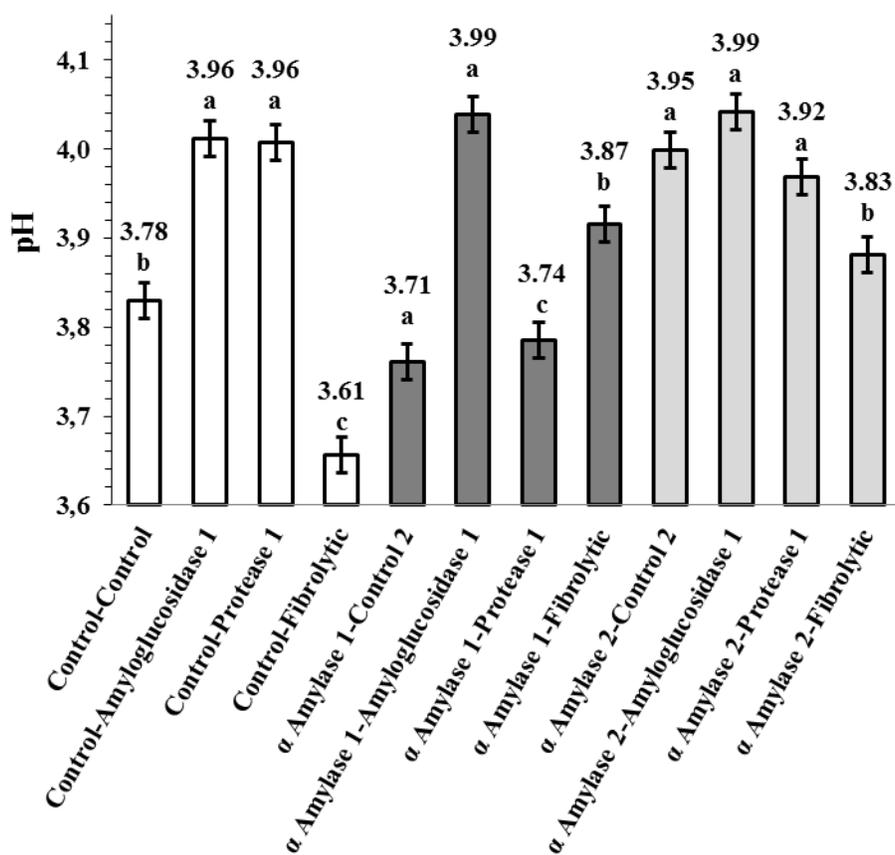


Figure 1. Rehydrated corn grain silage pH in response to enzyme addition.  $P < 0.01$  for the interaction of the enzymes in factor 1 (Control,  $\alpha$  Amylase 1,  $\alpha$  Amylase 2) and factor 2 (Control, Amyloglucosidase 1, Protease 1, Fibrolytic). Means with different letter differ at  $P < 0.05$  by pairwise t -test. Experiment 1 (N = 84 silos).

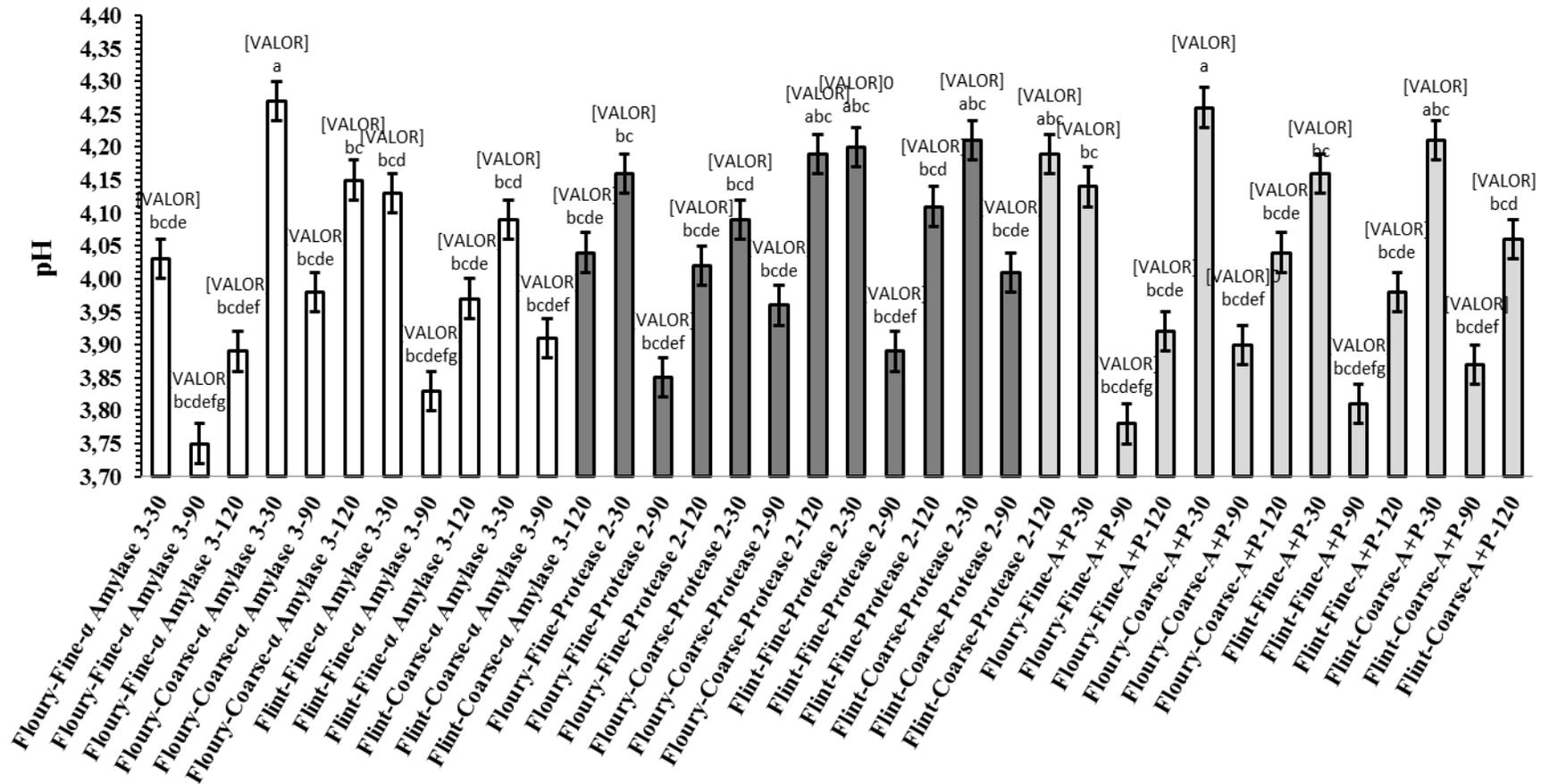


Figure 2. Rehydrated corn grain silage pH as affected by hybrid type (Floury, Flint), particle size (Fine, Coarse), enzyme addition [Amylase (A), Protease (P), A+P], and duration of ensilage (30, 90, 120 d). Means with different letter differ at  $P < 0.05$  (Pairwise  $t$ -test). Experiment 2 (N = 180).

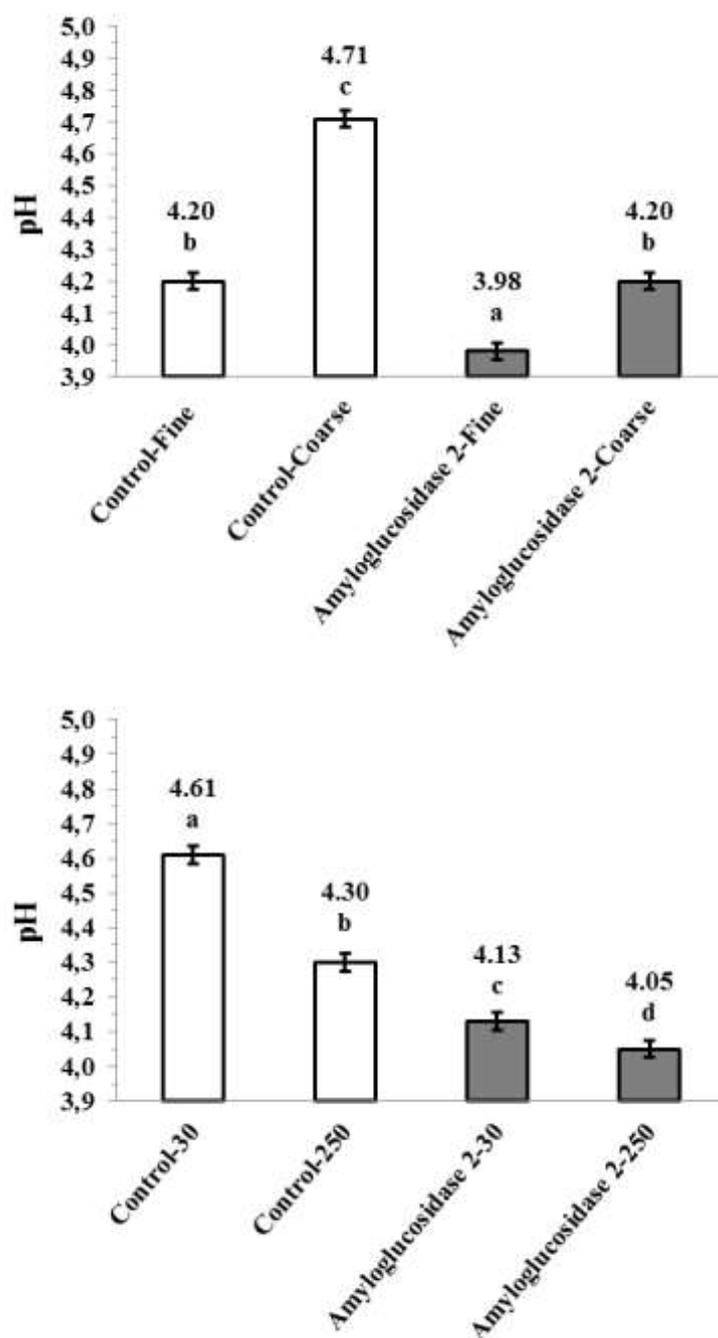


Figure 3. Rehydrated corn grain silage pH as affected by particle size (Fine, Coarse) enzyme addition (Control, Amyloglucosidase 2), and duration of ensiling (30 d, 250 d). Means with different letter differ at  $P < 0.05$  by pairwise  $t$ -test. Experiment 3 ( $N = 40$ ).

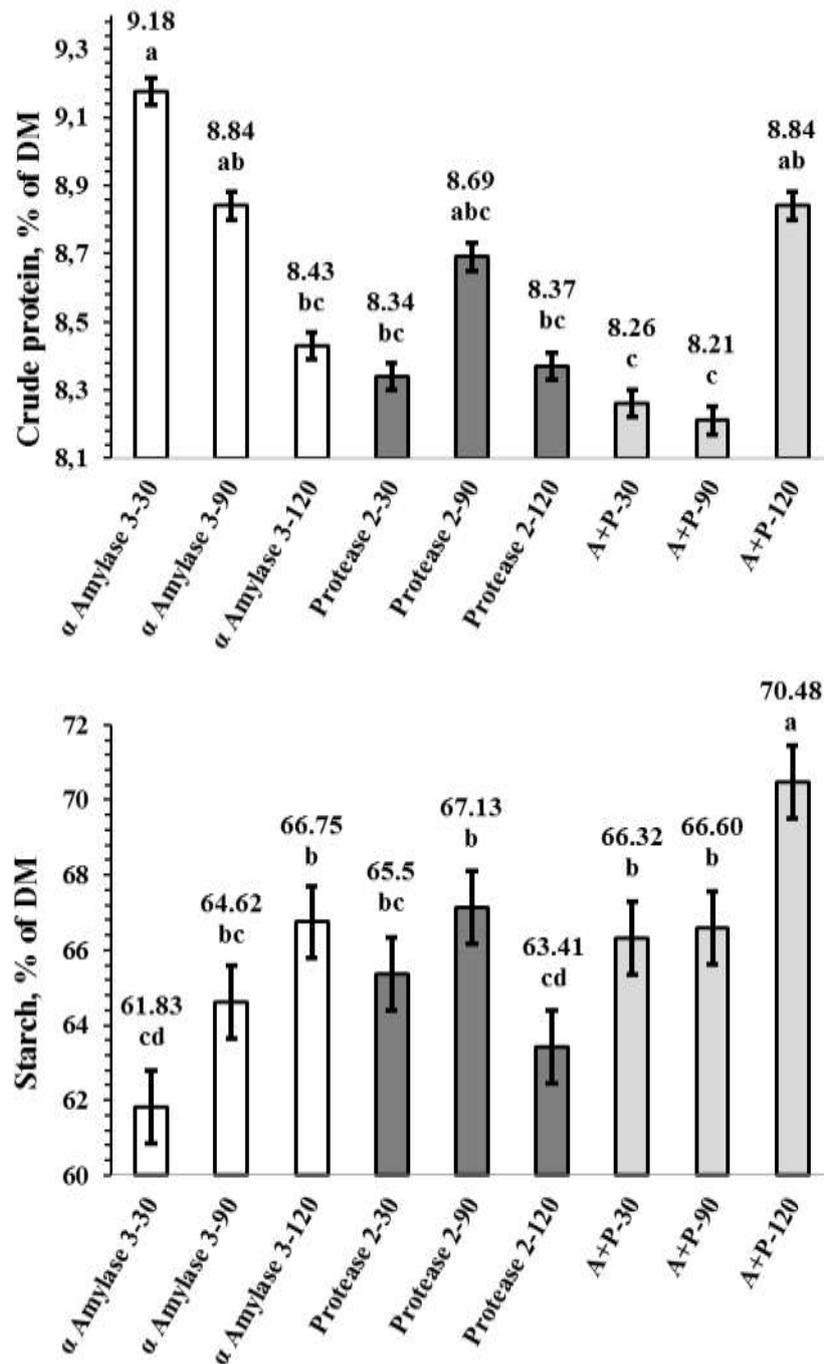


Figure 4. Rehydrated corn grain silage crude protein and starch concentration as affected by enzyme addition [ $\alpha$  Amylase 3 (A), Protease 2 (P), A+P] and duration of ensilage (30, 90, 120 d). Means with different letter differ at  $P < 0.05$  by pairwise t-test. Experiment 2 (N = 180).

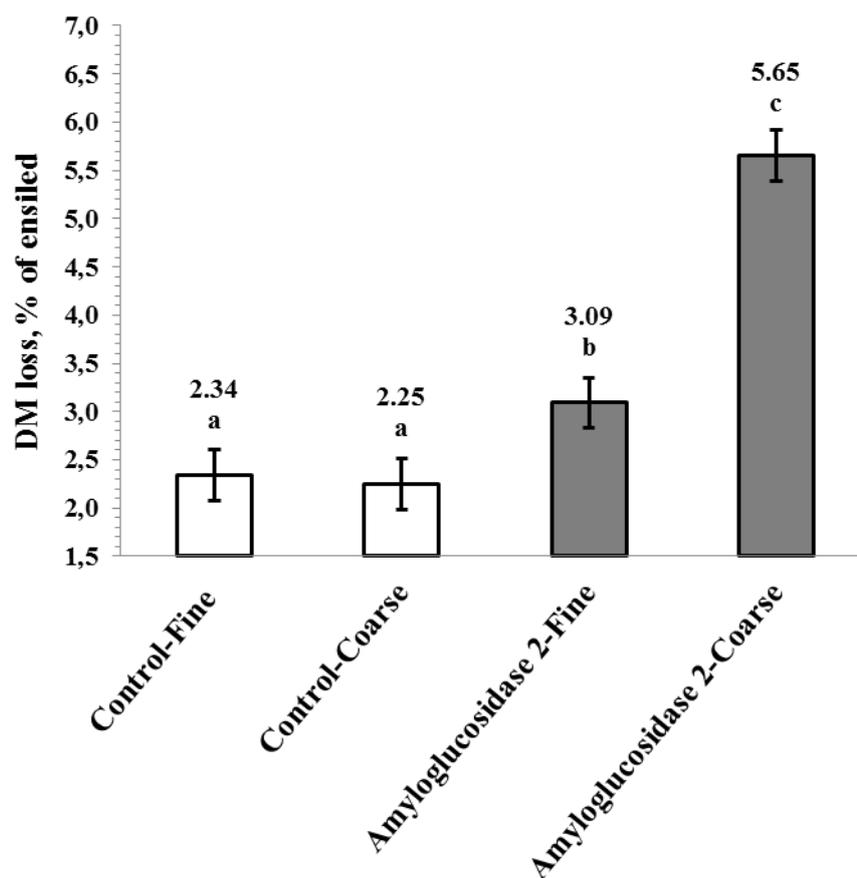


Figure 5. Rehydrated corn grain silage DM loss during ensiling as affected by particle size (Fine, Coarse) and enzyme addition (Control, Amyloglucosidase 2). Means with different letter differ at  $P < 0.05$  by pairwise t - test.

Experiment

3

(N

=

40).

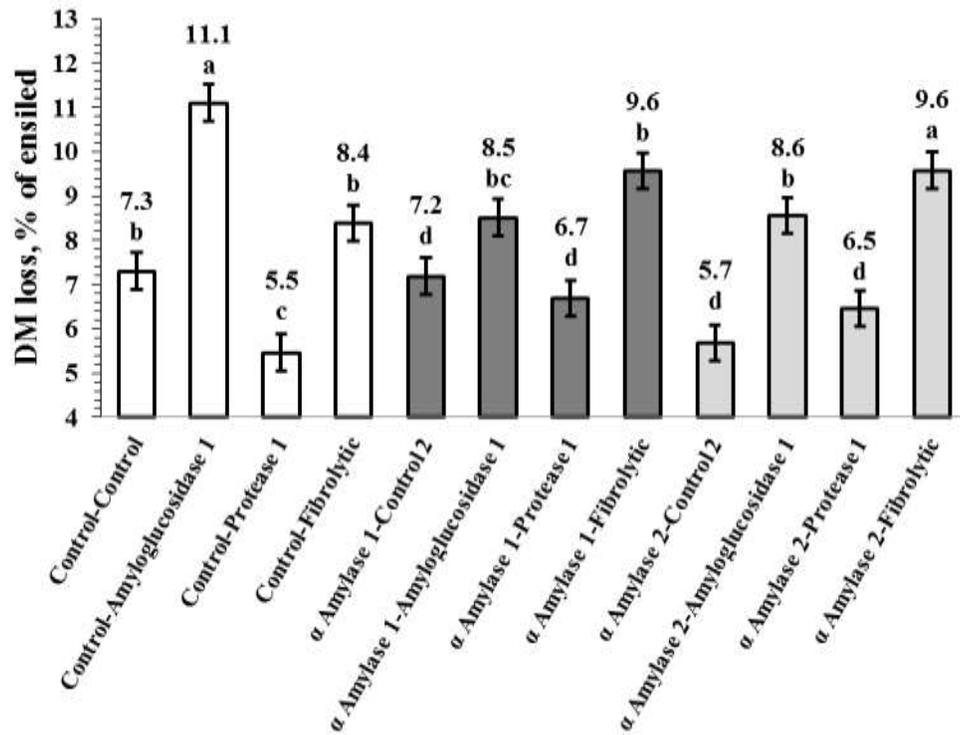


Figure 6. Rehydrated corn grain silage DM loss in response to enzyme addition.  $P < 0.01$  for the interaction of the enzymes in factor 1 (Control,  $\alpha$  Amylase 1,  $\alpha$  Amylase 2) and factor 2 (Control, Amyloglucosidase 1, Protease 1, Fibrolytic). Means with different letter differ at  $P < 0.05$  by pairwise t-test. Experiment 1 (N = 84 silos).

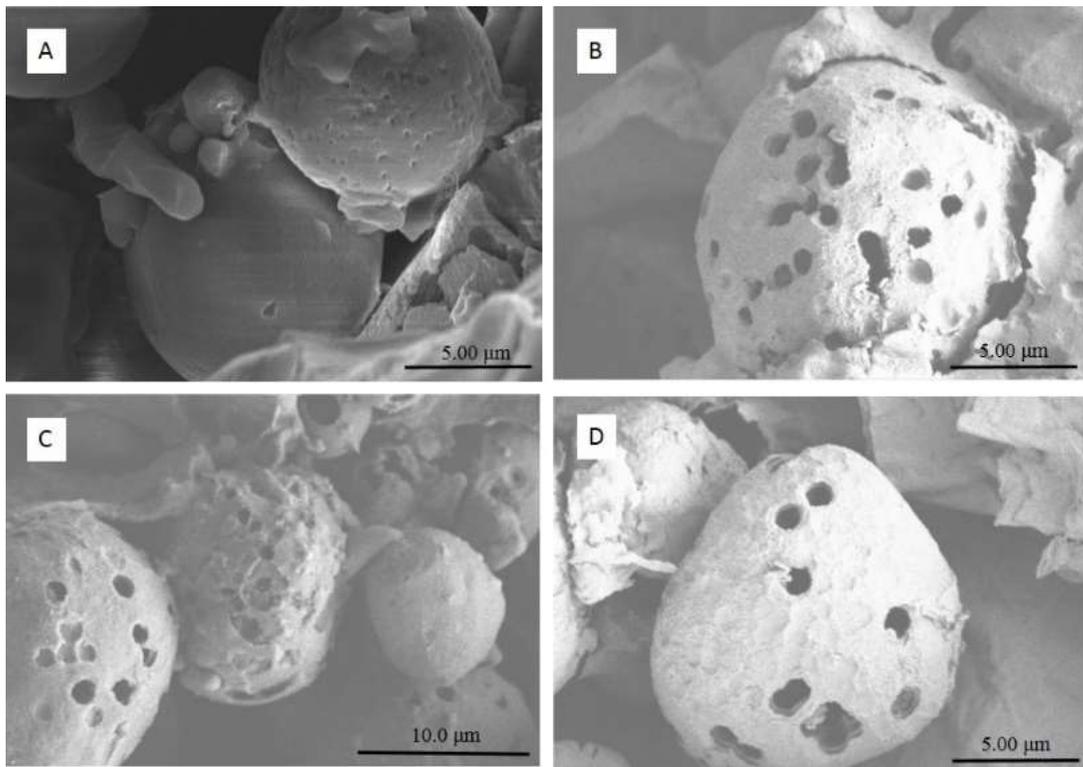


Figure 7. Scanning electron microscopy of starch granules of rehydrated corn grain silage after 30 days of ensiling. A: Control. B, C, and D: Amyloglucosidase 1. Experiment 1.

