



JOSIANE PEREIRA DOS SANTOS

**FIBROLYTIC ENZYME AND AEROBIC STABILITY OF
DIETS FOR DAIRY COWS**

**LAVRAS - MG
2022**

JOSIANE PEREIRA DOS SANTOS

**FIBROLYTIC ENZYME AND AEROBIC STABILITY OF DIETS FOR DAIRY
COWS**

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

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

LAVRAS - MG

2022

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

Santos, Josiane Pereira dos.
Fibrolytic enzyme and aerobic stability of diets for dairy cows /
Josiane Pereira dos Santos. - 2020.
109 p.: il.

Orientador: Marcos Neves Pereira.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2020.
Bibliografia.

1. Ácid propionic. 2. Feed efficiency. 3. Aerobic stability. 4.
Fungal extract. 5. Fiber. I. Pereira, Marcos Neves. II. Título.

JOSIANE PEREIRA DOS SANTOS

**FIBROLYTIC ENZYME AND AEROBIC STABILITY OF DIETS FOR DAIRY
COWS**

**ENZIMA FIBROLÍTICA E ESTABILIDADE AERÓBIA DE DIETAS PARA VACAS
LEITEIRAS**

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

APROVADA em 30 de outubro de 2020.

Dra. Carla Luiza Silva Ávila	UFLA
Dra. Ozana de Fátima Zacaroni	UFG
Dra. Renata A. Nogueira Pereira	EPAMIG
Dr. Erick Darlisson Batista	UFLA

Prof. Dr. Marcos Neves Pereira
Orientador

**LAVRAS - MG
2022**

AGRADECIMENTOS

Ao “SENHOR” que me conduz pelos caminhos da vida.

À minha Mãe Cida, ao meu Pai Mauro pelo amor, ensinamentos e exemplo, e aos meus irmãos Marcos Túlio, Maisa e Érika pelo apoio e incentivo sempre.

À minha prima Jéssica Nakamura pelo apoio e que mesmo de longe se fez presente.

Ao Professor Marcos pelos ensinamentos e exemplo de competência e comprometimento.

À Better Nature em nome da Renata, Rayana, Carlinhos, Sr. Antonio (*in memoriam*), Sebastião e Geraldo pela contribuição e apoio.

À Profa. Ozana, Dra Renata, Profa. Carla e ao Prof. Erick pela disponibilidade e contribuição para a tese.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão da bolsa de estudo e à UFLA por me acolher por 11 anos.

Aos amigos Tati, Paty, Paola, Renato, Ricardo, Júlia, Izabella, Fabiana, Karina, Isis, Eugênio e Victoria.

Ao Grupo do Leite e ao grupo de bolsistas, em especial ao Wesley, Lucas Carneiro, Josué e Rayana pelo esforço, dedicação e apoio na condução dos experimentos. A todos vocês o meu MUITO OBRIGADA por compartilharem conhecimentos, dividirem os trabalhos e somarem os bons momentos.

Aquelas com quem dividi muito mais do que o aluguel, dividi os melhores momentos e também as piores frustrações, por todo apoio, companheirismo e amizade Fofinha, Karla, Maria Helena, Stephanie e Samy.

Aos meus amigos Márcio Nogueira e “Sô” Marcos com quem tenho muito respeito, admiração e zelo.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para que este trabalho se tornasse uma realidade.

*Dedico
À minha prima Patrícia Ribeiro Faria (in memoriam).*

RESUMO

O uso de enzimas exógenas e de ácidos orgânicos aplicados a TMR podem aumentar o consumo e a digestibilidade dos alimentos para ruminantes melhorando a eficiência alimentar. O primeiro experimento avaliou o efeito de uma preparação enzimática com atividades de celulase e xilanase no desempenho da lactação, eficiência alimentar, digestibilidade da dieta, fermentação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com dieta à base de silagem de milho. Vinte e oito vacas Holandesas foram alimentadas individualmente por 56 d. Os tratamentos foram controle (CTL) ou enzima (ENZ. 0,75 mL/kg de matéria seca da dieta). O CMS (21,0 kg/d), a digestibilidade da FDN (46,1%) e do amido (93,6%), a produção de leite (26,3 kg/d) e a relação leite/CMS (1,34) não diferiram. A proporção molar de propionato a ser reduzida (19,7 vs. 18,5%) no ENZ, induzindo uma tendência para aumento da razão acetato para propionato (3,59 vs. 3,29). O ENZ tendeu a aumentar a concentração de gordura do leite, aumentou a concentração de proteína do leite nas semanas 6 e 8 e aumentou a concentração de sólidos do leite. O ENZ aumentou o N-ureia no leite na semana 3 e tendeu a aumentar o N-ureia no plasma, sugerindo atividade de protease. O ENZ não teve efeito na digestibilidade da fibra e na eficiência alimentar, mas teve efeito no perfil de fermentação ruminal e aumentou a concentração de sólidos do leite. No segundo e terceiro experimentos foram avaliados os efeitos de produtos comerciais a base de ácidos orgânicos sobre estabilidade aeróbia de uma TMR à base de silagem de milho. No experimento 2 os tratamentos foram: Controle (CTL), propionato de cálcio a 1 (PC1), 1,5 (PC1,5) ou 2 (PC2) kg/ton, e Fresh Cut Plus (ácidos acético, benzoico e propiônico, hidróxido de amônio, polisorbato) a 1 (FC1), 1,5 (FC1,5) ou 2 (FC2) L/ton. Os tratamentos foram misturados a 5 kg de TMR e colocados em 6 baldes mantidos em uma sala com ambiente controlado ($29,1 \pm 1,7$ °C) por 48 h. A temperatura máxima (46,7 °C) e a estabilidade aeróbia não foram diferentes para os tratamentos. Os tratamentos FC1,5 (32,4 °C) e FC2 (32,2 °C) reduziram a temperatura de 0-24 h da TMR em relação ao CTL (34,8 °C). Os aditivos não afetaram ($P \geq 0,63$) a temperatura de 24-48 h (44,4 °C). As contagens (log ufc/g) de bactérias aeróbias e formadoras de esporos foram reduzidas por PC2 (4,77 vs. 4,11) e FC1,5 (3,86 vs. 3,27). A contagem de leveduras tendeu a ser reduzida em FC1 (0,98 vs 2,71). A contagem de fungos filamentosos foi reduzida por PC2 (1,59), FC1 (1,37), FC1,5 (1,07) e FC2 (1,73) em relação ao controle. O produto FC foi mais eficiente em reduzir a temperatura da TMR de 0-24 h e o crescimento microbiano do que o produto PC. O uso de enzimas exógenas pode melhorar a eficiência de alimentação de vacas leiteiras e o estabilizante FC1,5 e FC2 reduziu a temperatura da TMR de 0 a 24 h e foi mais inibidor do crescimento microbiano do que o produto PC.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Eficiência alimentar. Estabilidade aeróbia. Extrato fúngico. Fibra.

ABSTRACT

The use of exogenous enzymes and organic acids applied to TMR can increase feed intake and digestibility for ruminants improving feed efficiency. The first experiment evaluated the effect of an enzyme preparation with cellulase and xylanase activities on lactation performance, feed efficiency, diet digestibility, ruminal fermentation of dairy cows fed a corn silage diet. Twenty-eight Holstein cows were individually fed for 56 d. The treatments were control (CTL) or enzyme (ENZ. 0.75 mL/kg of dry matter in the diet). DMI (21.0 kg/d), NDF (46.1%) and starch (93.6%) digestibility, milk production (26.3 kg/d) and the milk/DMI ratio (1.34) did not differ. The molar ratio of propionate to be reduced (19.7 vs. 18.5%) in the ENZ, inducing a trend towards an increase in the acetate to propionate ratio (3.59 vs. 3.29). ENZ tended to increase milk fat concentration, increased milk protein concentration at weeks 6 and 8, and increased milk solids concentration. ENZ increased milk N-urea at week 3 and tended to increase plasma N-urea, suggesting protease activity. ENZ had no effect on fiber digestibility and feed efficiency but had an effect on rumen fermentation profile and increased milk solids concentration. In the second and third experiments, the effects of commercial products based on organic acids on the aerobic stability of a TMR based on corn silage were evaluated. In experiment 2 the treatments were: Control (CTL), calcium propionate at 1 (PC1), 1.5 (PC1.5) or 2 (PC2) kg/ton, and Fresh Cut Plus (acetic, benzoic and propionic acids, ammonium hydroxide, polysorbate) at 1 (FC1), 1.5 (FC1.5) or 2 (FC2) L/ton. Treatments were mixed with 5 kg of TMR and placed in 6 buckets kept in a controlled environment room (29.1 ± 1.7 °C) for 48 h. The maximum temperature (46.7 °C) and aerobic stability were not different for the treatments. The treatments FC1.5 (32.4 °C) and FC2 (32.2 °C) reduced the temperature from 0-24 h of TMR in relation to CTL (34.8 °C). The additives did not affect ($P \geq 0.63$) the temperature of 24-48 h (44.4 °C). Counts (log cfu/g) of aerobic and spore-forming bacteria were reduced by CP2 (4.77 vs. 4.11) and FC1.5 (3.86 vs. 3.27). Yeast counts tended to be reduced in FC1 (0.98 vs 2.71). The filamentous fungi count was reduced by PC2 (1.59), FC1 (1.37), FC1.5 (1.07) and FC2 (1.73) in relation to the control. The FC product was more efficient in reducing the 0-24 h TMR temperature and microbial growth than the PC product. The use of exogenous enzymes can improve the feeding efficiency of dairy cows and the stabilizer FC1,5 and FC2 reduced the TMR temperature from 0 to 24 h and was more inhibitory to microbial growth than the PC product.

Keywords: Propionic acid. Feed efficiency. Aerobic stability. Fungal extract. Fiber.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Celulossoma.....	16
Figura 2 - Mecanismo de ação de ácidos fracos na forma não dissociada na célula microbiana.	32

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Figure 1. Milk protein concentration on treatments Control (—●—) and Enzyme (—○—). $P = 0.45$ for treatment, $P = 0.04$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.02$ on wk 6, $P = 0.04$ on wk 8.	70
Figure 2. Milk urea-N concentration (MUN) on treatments Control (—●—) and Enzyme (—○—). $P = 0.65$ for treatment and $P = 0.10$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.05$ on wk 3.....	71
Figure 3. Plasma urea-N (PUN) on treatments Control (—●—) and Enzyme (—○—). $P = 0.06$ for treatment and $P = 0.10$ for the interaction between treatment and hour. Slice option: $P = 0.06$ at 3 h and $P = 0.08$ at 6 h post-feeding.	72

ARTIGO 2

Figura 1. Temperatura do ambiente e das dietas tratadas com aditivos estabilizantes. Erro padrão das médias = 0,76 CTL: Controle. CTL: Controle. PC1: Propionato de Cálcio 1 kg/ton. PC1,5 Propionato de Cálcio 1,5 kg/ton. PC2 Propionato de Cálcio 2 kg/ton. FC1 Fresh Cut 1 L/ton. FC1,5 Fresh Cut 1,5 L/ton. FC2 Fresh Cut 2 L/ton. $P = 0,99$ para efeito fixo de tratamento; $P < 0,01$ para efeito fixo de hora e $P = 0,86$ para efeito fixo da interação entre tratamento e hora.	91
--	----

ARTIGO 3

Figura 1. Temperatura do ambiente e das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

Erro padrão das médias = 0,83. CTL: Controle. MZ55-B: Moldzap 55 Baixo.

MZ55-A: Moldzap 55 Alto. MZAQ-B: Moldzap Aquativa Pó Baixo. MZAQ-

A: Moldzap Aquativa Pó Alto. MZSO-B: Moldzap Aquativa Sorbato Baixo.

MZSO-A: Moldzap Aquativa Sorbato Alto. $P = 0,67$ para efeito fixo de

tratamento; $P < 0,01$ para efeito fixo de hora e $P = 0,99$ para efeito fixo da

interação entre tratamento e hora..... 109

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Table 1.** Ingredient and nutrient composition (% of dry matter) and particle size distribution of diets on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)..... 65
- Table 2.** Total tract apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), Non-NDF OM, and starch, digestible OM intake (DOMI), feed efficiency during digestibility measurements, intake and defecation of intact corn kernels, and fecal yield, composition, and viscosity on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)..... 66
- Table 3.** Dry matter intake (DMI), lactation performance, milk urea-N (MUN), feed efficiency, body weight (BW) and condition score (BCS), and milk somatic cell count (SCC) on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ) 67
- Table 4.** Molar proportions of total volatile fatty acids (VFA), pH, and total protozoa concentration in reticular fluid, urinary allantoin excretion, and allantoin/digestible organic matter intake (DOMI) on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ) 68
- Table 5.** Dry matter intake (DMI) and orts, proportion of intake in periods of the day, starch, neutral detergent fiber (NDF), and particle size sorting behaviors, and chewing behavior on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ) 69

ARTIGO 2

- Tabela 1.** Temperatura máxima, momento da temperatura máxima, estabilidade aeróbia, e temperatura e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes..... 88
- Tabela 2.** Temperatura mensurada a cada 30 min por 48 h e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes. 89
- Tabela 3.** Bactérias aeróbias totais, bactérias formadoras de esporos, leveduras e fungos filamentosos após 24 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes..... 90

ARTIGO 3

Tabela 1. Temperatura máxima, momento da temperatura máxima, estabilidade aeróbia, e temperatura e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.....	106
Tabela 2. Temperatura mensurada a cada 30 min por 48 h e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.	107
Tabela 3. Bactérias aeróbias totais, bactérias formadoras de esporos, leveduras e fungos filamentosos após 24 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.....	108

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1	Enzimas fibrolíticas.....	15
3.1.1	Carboidratos fibrosos na alimentação de vacas leiteiras	15
3.1.2	Hidrólise ruminal da celulose e hemicelulose.....	15
3.1.3	Classificação de enzimas fibrolíticas e mensuração da atividade enzimática	18
3.1.4	Enzimas fibrolíticas exógenas	20
3.1.5	Modo de ação de enzimas fibrolíticas exógenas	20
3.1.6	Efeito pré-ingestivo de enzimas fibrolíticas exógenas	21
3.1.7	Efeito ruminal de enzimas fibrolíticas exógenas	22
3.1.8	Sinergismo entre enzimas fibrolíticas exógenas e microrganismos do rúmen	22
3.1.9	Efeito pós-ruminal de enzimas fibrolíticas exógenas	23
3.1.10	Efeito de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o metabolismo e produção de leite.....	24
3.2	Deterioração aeróbia de alimentos úmidos	29
3.2.1	Propriedades dos ácidos orgânicos.....	30
3.2.2	Ácidos orgânicos como controladores da deterioração aeróbia.....	32
	REFERÊNCIAS.....	35
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	46
	ARTIGO 1 - DIET DIGESTIBILITY AND LACTATION PERFORMANCE OF DAIRY COWS FED FIBROLYTIC ENZYMES	46
	ARTIGO 2 - EFICÁCIA DE ADITIVOS QUÍMICOS SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO E A ESTABILIDADE AERÓBIA DA DIETA DE VACAS LEITEIRAS	73
	ARTIGO 3 - ESTABILIDADE AERÓBIA DA DIETA DE VACAS LEITEIRAS ADITIVADAS COM INIBIDORES DE CRESCIMENTO MICROBIANO	92

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Com o intuito de otimizar a eficiência da alimentação em sistemas de produção de leite, aditivos alimentares, como enzimas exógenas e estabilizantes da dieta, têm sido desenvolvidos. Os aditivos enzimáticos, normalmente enzimas fibrolíticas ou amilolíticas, são utilizados para aumentar o fluxo de nutrientes digestíveis para o animal, já que enzimas exógenas podem melhorar a digestibilidade no rúmen e no intestino de ruminantes, além de poder atuar sobre o perfil fermentativo e a síntese de proteína microbiana no rúmen. A resposta de vacas leiteiras à suplementação enzimática é variável e dependente do produto sendo suplementado, da forma de inclusão à dieta, da duração e do local de contato entre a enzima e o substrato dietético, da composição da dieta basal, do nível de consumo e produtividade dos animais, dentre outros fatores. Portanto, a suplementação com enzimas fibrolíticas pode melhorar o desempenho ou a eficiência alimentar (Leite/Consumo) de vacas leiteiras, mas a resposta animal à suplementação é variável.

A estabilidade aeróbia pode ser definida como o período de tempo em que alimentos permanecem com pouco aquecimento após serem ofertados aos animais no cocho. O calor oriundo de metabolismo celular e da atividade microbiana sobre a dieta ofertada pode deprimir o consumo de alimentos e o desempenho de vacas leiteiras. O uso de estabilizantes químicos, como ácidos orgânicos (ácidos propiônico e acético) e antifúngicos (ácidos sórbico e benzoico), pode propiciar a redução na frequência de alimentações diárias do rebanho e do trabalho para alimentação. Estabilizantes químicos podem ser úteis quando a composição da dieta e a condição ambiental propiciam aquecimento rápido da dieta ofertada no cocho. Alimentos naturalmente ácidos, como forragens ensiladas, são mais estáveis no cocho que forragens frescas e são menos estáveis que forragens fenadas. Ambientes quentes reduzem a estabilidade aeróbia da dieta de vacas leiteiras, o que torna a baixa estabilidade uma questão nutricional de maior pertinência em zonas tropicais e no verão de regiões temperadas.

2 OBJETIVOS

- a) Avaliar o efeito da suplementação de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o consumo de alimentos, o desempenho leiteiro, a atividade mastigatória, a fermentação ruminal e a digestibilidade de nutrientes em vacas leiteiras.
- b) Avaliar o efeito de aditivos químicos sobre a estabilidade aeróbia de dieta total baseada em silagem de milho para vacas leiteiras.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Enzimas fibrolíticas

3.1.1 Carboidratos fibrosos na alimentação de vacas leiteiras

Assume-se que o total de carboidratos fibrosos da dieta de ruminantes é composto por celulose, hemicelulose e lignina, mesmo o último sendo um composto fenólico. A fibra em detergente neutro (FDN) constitui o parâmetro mais usado para a descrição química da fibra na formulação de dietas para ruminantes (VAN SOEST, ROBERTSON e LEWIS, 1991), pois se relaciona matematicamente ao consumo e à digestibilidade da matéria seca (MS) (MERTENS, 1987). O excesso de FDN na dieta pode limitar o consumo de energia e a falta de FDN pode induzir acidose ruminal. As diferenças de digestibilidade e nas características físicas das fontes de FDN, como tamanho da partícula e densidade, podem afetar o microbioma e o perfil fermentativo do rúmen, a produção de componentes do leite e a saúde e a longevidade de vacas leiteiras (ZEBELI, et al. 2012).

O aproveitamento de alimentos fibrosos pelos ruminantes está relacionado à síntese e secreção de enzimas pelos microrganismos do rúmen, promovendo a hidrólise dos carboidratos fibrosos (MORAIS e MIZRAHI, 2019). Segundo Tommé, Warren e Gilkes (1995), tanto na saliva como no suco pancreático dos mamíferos existem enzimas hidrolíticas capazes de catalisar a quebra das ligações glicosídicas α -1,4 do amido e do glicogênio, mas não das ligações β -1,4 da celulose. Assim alguns microrganismos, como os que habitam o rúmen e o intestino grosso de herbívoros, são capazes de hidrolisar as ligações β -1,4 da celulose e utilizá-la como fonte de energia, gerando proteína microbiana e energia na forma de ácidos graxos voláteis (AGV) para o animal.

Os carboidratos fibrosos são nutrientes essenciais para os ruminantes. A dieta de vacas leiteiras deve conter um teor mínimo de fibra longa e efetiva para a manutenção da mastigação, motilidade do rúmen, produção de saliva e absorção de AGV, mantendo a normalidade na função microbiana no rúmen (VAN SOEST, 1994).

3.1.2 Hidrólise ruminal da celulose e hemicelulose

Para que ocorra o início da degradação do alimento no rúmen, o primeiro passo é a aderência do microrganismo à superfície do alimento para que as enzimas digestivas microbianas se justaponham a seus substratos específicos (WEIMER, 1998). A digestão da celulose foi prejudicada quando se adicionou metilcelulose, a qual bloqueia a adesão da bactéria

Diversos fatores podem afetar a adesão e a colonização ao substrato e ainda a atividade fibrolítica das bactérias ruminais como por exemplo: pH ruminal (MORGAVI et al., 2000); competição microbiana, características do substrato como presença de cutícula, área de superfície, hidratação, carga iônica e capacidade de troca iônica, e fatores relacionados ao ambiente ruminal como temperatura, saturação de O₂ e concentração de carboidratos solúveis (MIRON; BEN-GHEDALIA; MORRISON, 2001).

As enzimas presentes no celulosoma são classificadas de acordo com o local de atuação na molécula de celulose, e são divididas em três grandes grupos: endoglucanases, exoglucanases e β -glicosidases e a hidrólise da celulose exige ação sinérgica dessas três enzimas (LIU et al., 2013). Primeiramente as endoglucanases (EnG: 1,4- β -D-glucana-4-glucano-hidrolase) iniciam a hidrólise da molécula de celulose, quebrando as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos (DIENES; EGYHÁZI; RÉCZEY, 2004). Em seguida o grupo das exoglucanases que são constituídos pelas celobiohidrolases (CBHs: 1,4- β -D-glucana-celobio-hidrolase) e glucanohidrolases (GHs: 1,4- β -D-glucana-glucano-hidrolase). As GHs são capazes de liberar glicose diretamente do polímero (LYND et al., 2002) e as CBHs liberam celobiose a partir da extremidade da molécula de celulose (CAO; TAN, 2002). As exoglucanases são responsáveis pela desestruturação das regiões cristalinas da celulose, envolvendo ruptura física do substrato aumentando a sua hidrólise (ZHANG; LYND, 2004). Por fim ocorre ação das β -glicosidases ou celobiasas (BG: β -glicosideo gluco-hidrolase) que atua sobre a celobiose, liberada da molécula de celulose pelas CBHs, e oligossacarídeos solúveis transformando-os em glicose (ANDRIC et al., 2010). A ação das β -glicosidases além de finalizar a despolimerização contribui muito com o processo consumindo celobiose, que é um inibidor de endo e exoglucanases (OLSEN et al., 2011). As hemicelulases ou xilanases são um grupo de enzimas que degradam o polissacarídeo linear β -1,4-xilano (xilanas) até a unidade básica xilose (pentose). A degradação enzimática das xilanas ocorre pela ação conjunta de endo e exo-xilanases (β -1,4- D-xilana hidrolase), que hidrolisam a cadeia principal da xilana, e β -xilosidases (β -D-xilosideo xilohidrolase) que degradam xilo-oligômeros até a unidade básica, a xilose. Quando a cadeia de hemicelulose é heterogênea, outras hemicelulases como a β -manosidase, α -L-arabinofuranosidase, α -D-glucuronidase, α -D galactosidase, acetil xilano esterase, e esterase de ácido ferrúlico são necessárias para a hidrólise (BEAUCHEMIN; YANG; RODE, 2003; BHAT; HAZLEWOOD, 2001).

3.1.3 Classificação de enzimas fibrolíticas e mensuração da atividade enzimática

As enzimas são proteínas, macromoléculas orgânicas constituídas por resíduos de aminoácidos. As unidades de aminoácidos são ligadas através de ligações peptídicas, formadas pela junção de um átomo de carbono de um grupo carbonílico e um átomo de nitrogênio de um grupo α -amino terminal de outro aminoácido (LEHNINGER, 2000). Assim, cada enzima contém uma sequência específica de aminoácidos, a qual constitui sua estrutura primária e que após adquirir a forma de estrutura tridimensional de elevada complexidade (estruturas secundária, terciária e quaternária) passa a ser dotada de atividade catalítica biológica específica. Os principais tipos de interações responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas são formados por ligações de hidrogênio, interações apolares (hidrofóbicas), pontes de dissulfeto (produzidas pela oxidação de resíduos de cisteína) e forças eletrostáticas entre resíduos de aminoácidos ionizados (ILLANES, 2008).

Na classificação internacional sistemática, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reação catalisada, sendo elas: oxidorredutases (reações de oxidação-redução), transferases (reações transferência de grupos), hidrolases (reações de hidrólise), liases (remoção de grupos para formar ligações duplas), isomerases (isomerização), e ligases (formação de ligações entre duas moléculas) (NELSON; MICHAEL; COX, 2007). As enzimas fibrolíticas fazem parte do grupo das hidrolases (PALOHEIMO; PIRONEN; VEHAMAAANPERA, 2011). Como aprimoramento dessa classificação a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) leva em consideração as características estruturais das enzimas e propõe um sistema algoritmo que atribui sequências numéricas classificatórias para as inúmeras famílias de enzimas existentes.

As celulases são classificadas da seguinte forma: Endoglucanases (EC 3.2.1.4; 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases), Exoglucanases (EC 3.2.1.91; 1,4- β -D-glucana-4-glucanohidrolases) e β -glucosidase (EC 3.2.1.21; β -glicosídeo glucanohidrolases). A classificação das hemicelulases (xilanases) é um pouco mais complexa pois esse grupo é formado por uma grande quantidade de enzimas e são classificadas como (POUTANEN, 1988; SHALLOM; SHOHAN, 2003):

- a) 4-xilanhidrolase β -D-xilano (endoxilanase EC 3.2.1.8): são endoglicosidases que clivam as ligações 1,4- β -D-xilosídica em xilanos que resultam em xilooligômeros;
- b) Xilohidrolase-4- β -D-xilano (β -xilosidase EC 3.2.1.37): são exoglicosidases que clivam as ligações dos xilo-oligossacarídeos e xilobiose;

- c) α -L-arabinofuranósido (α -arabinosidase - EC 3.2.1.55): são α -arabinosidasas que catalisam os terminais não redutores α -L-arabinofuranósido em α -L-arabinofuranosídeos, arabinanos, arabinoxilanos e arabinogalactanos, liberando arabinose);
- d) α -Glucosiduronase; (α -glucuronidase EC 3.2.1.139): catalisam a hidrólise de α -D-glucuronosídeo em um álcool e D-glucuronato;
- e) Acetilxilana esterase EC 3.2.1.72: catalisam a desacetilação de xilanos e xilo-oligossacarídeos;
- f) 4-Hidroxi-3-metoxicinamoil-açúcar hidrolase (ácido ferúlico esterase e ácido p-cumárico ácido esterase EC 3.1.1.73): catalisam a hidrólise de feruloil de polissacarídeos esterificados para liberar ferulato.

A atividade enzimática é expressa como “U” e uma unidade (U) é resultado da transformação em 1 μ mol de produto por minuto, nas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg), ou atividade por grama (U/g). A velocidade das reações enzimáticas varia de acordo com a concentração de enzimas e/ou de substratos, temperatura e pH. A atividade da celulose é medida como açúcares redutores solúveis e é entendida como resultado da ação completa do complexo celulolítico (SHUNGQI et al., 2011).

O primeiro obstáculo na mensuração da atividade enzimática é a heterogeneidade dos carboidratos fibrosos presentes nas plantas, devido à sua complexidade este não é o substrato ideal para ensaios enzimáticos (BEAUCHEMIN et al., 2003). Portanto, atividade enzimática da degradação de fibras é determinada medindo a taxa de liberação de açúcares redutores de substratos puros, com unidades enzimáticas expressas como quantidade de açúcares redutores liberados por unidade de tempo por unidade de enzima. Esses ensaios devem servir para facilitar comparações com outros estudos, mas os resultados não devem ser usados para escolher enzimas promissoras para melhorar a qualidade da forragem ou desempenho animal, que deve utilizar substratos similares à forragem em estudo (ADESOGAN et al., 2014).

O substrato mais comumente utilizado para medir a atividade celulase é a carboximetilcelulose (CMC). Esta atividade é muitas vezes erroneamente assumida como celulase total ou verdadeira. Atividade sobre a CMC realmente mede endocelulase, e tem pouco ou nenhuma inferência sobre exoglucanase (WOOD; BHAT, 1988). A atividade da exoglucanase pode ser mensurada utilizando a celulose cristalina como por exemplo Avicel e a atividade de β -glucosidase é determinada pela medição da liberação de glicose de celobiose

(BHAT; HAZLEWOOD, 2001). A atividade de xilanase é mais comumente medida pela determinação da liberação de açúcares redutores de xilanos em substratos como farelo de aveia ou madeira. Xilanases são específicas para ligações β -1,4 internas dentro da molécula de xilana, e são geralmente consideradas endoxilanases (BHAT; HAZLEWOOD, 2001). A falta de padronização dos ensaios de atividades de celulase e xilanase, e a expressão dos resultados com diferentes unidades também tem prejudicado o progresso das pesquisas com enzimas fibrolíticas exógenas (EFE).

3.1.4 Enzimas fibrolíticas exógenas

Enzimas utilizadas na alimentação animal são produzidas por microrganismos específicos através da metabolização de nutrientes presentes do meio de cultivo, seguida pela síntese de enzimas. Extratos enzimáticos provenientes do mesmo microrganismo podem apresentar atividades enzimáticas amplamente diferentes, a depender da cepa selecionada, meio de cultura utilizado e substrato utilizado para o crescimento (LEE, 1997). Comercialmente são utilizadas cepas clássicas ou geneticamente modificadas para produzir essas enzimas em que o fungo *Trichoderma* spp. é um dos mais conhecidos sistemas de produção industrial (PALOHEIMO; PIRONEN; VEHEMAANPERA, 2011).

Os aditivos enzimáticos são classificados com base nos compostos que degradam, como as celulasas, xilanases que atuam sobre a celulose e xilana, respectivamente (McALLISTER et al., 2001). Os aditivos desenvolvidos para utilização na nutrição animal são compostos, na maioria das vezes, por misturas de enzimas e que podem apresentar atividades secundárias como amilases, proteases e/ou pectinases (McALLISTER et al., 2001). A escolha para utilização do microrganismo que irá produzir o aditivo enzimático está ligada ao crescimento acelerado, cepas com alto potencial de produção industrial, meio de cultivo de baixo custo e método prático de extração das enzimas. Os microrganismos mais utilizados para produção de aditivos enzimáticos são formados por quatro espécies de bactérias (*Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum* e *Streptococcus faecium*, spp.) e três espécies de fungos (*Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei* e *Saccharomyces cerevisiae*) (MUIRHEAD, 1996).

3.1.5 Modo de ação de enzimas fibrolíticas exógenas

O mecanismo de ação das enzimas exógenas adicionadas em dietas para ruminantes ainda não é totalmente compreendido. São vários mecanismos propostos, dentre eles a hidrólise

direta ao entrar em contato com o alimento antes da ingestão pelos animais (COLOMBATTO et al., 2003a), a estimulação de microrganismos à adesão aos substratos no rúmen (MORGAVI et al., 2004; YANG; BEAUCHEMIN; RODE, 1999), e a diminuição da viscosidade da digesta que melhora a absorção de nutrientes por favorecer o contato com seus sítios de absorção (HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 2000).

A adição de enzimas aos alimentos antes da ingestão pelos animais pode facilitar a ação das enzimas sobre a fibra melhorando sua digestibilidade, pois libera açúcares redutores o que pode favorecer o crescimento de microrganismos, auxiliar na colonização do substrato e consequentemente na digestão (MARTINS et al., 2007, 2008). Existem vários trabalhos que relatam o uso da suplementação de enzimas para vacas leiteiras, entretanto é difícil prever o mecanismo de ação dessas enzimas sobre o desempenho pois os resultados são muito variáveis. A seguir serão abordados os possíveis modos de ação de EFE.

3.1.6 Efeito pré-ingestivo de enzimas fibrolíticas exógenas

A aplicação de EFE tem sido mais efetiva quando aplicadas aos alimentos antes do fornecimento destes aos animais (BEAUCHEMIN et al., 2003) do que aplicação de enzimas diretamente no rúmen (LEWIS et al., 1999; SUTTON et al., 2003). A aplicação de EFE antes da alimentação provoca a liberação de açúcares redutores e em alguns casos pode ocorrer solubilização parcial da fibra insolúvel em detergente neutro (FDN) e da fibra insolúvel em detergente ácido (FDA) (HRISTOV et al., 1996; KRAUSE et al., 1998), o que pode beneficiar o rápido crescimento de alguns microrganismos e diminuir o tempo necessário para iniciar a degradação dos nutrientes (FORSBERG; FORANO; CHESSON, 2000). Colombatto et al. (2003) avaliaram dois produtos de EFE comerciais A (*Aspergillus niger e Trichoderma spp.*) e B (*Trichoderma reesei*) com atividade de celulase e xilanase aplicados 20 horas antes da incubação com fluido ruminal e constataram que os produtos diferiram quanto à atividade enzimática e que o produto A foi mais eficiente em liberar a fração solúvel do feno de alfafa. Martins et al. (2008) observaram interação entre preparação enzimática e tipo de forragem para a fração solúvel, onde a mesma preparação enzimática com atividade de celulase e de xilanase, proveniente dos fungos *Aspergillus niger e Trichoderma longibrachiatum*, apresentaram atividades diferentes sobre a palha de arroz e silagem de milho. Na silagem de milho a enzima aumentou a fração solúvel da matéria seca (MS) e da proteína bruta (PB), sem efeitos sobre a palha de arroz.

No entanto, o grau de liberação de açúcar é dependente do tipo de ingrediente que compõe a dieta, bem como o tipo e concentração de enzimas utilizadas. Por exemplo, apenas

duas de 11 enzimas testadas foram capazes de liberar quantidades mínimas de açúcares redutores da silagem de cevada (HRISTOV et al., 1996). Wallace et al. (2001) constataram que a mesma preparação enzimática proporcionou maior produção de gás em silagem de gramíneas comparado a silagem de milho (1,02 vs. 1,56 mL/h). Eun e Beauchemin (2007) relataram maior degradabilidade da FDN (13 vs. 19%, para feno de alfafa e silagem de milho, respectivamente) utilizando a mesma dose da preparação enzimática.

3.1.7 Efeito ruminal de enzimas fibrolíticas exógenas

Por muito tempo assumiu-se que as enzimas eram rapidamente inativadas por proteases ruminais (KOPECNY; MAROUNEK; HOLUB, 1987), mas trabalhos desenvolvidos posteriormente demonstraram estabilidade de enzimas exógenas no ambiente ruminal (FONTES et al., 1995; HRISTOV; MCALLISTER; CHENG, 1998; MORGAVI et al., 2000a). As atividades de celulase e xilanase de alguns produtos enzimáticos foram perceptivelmente estáveis, com pouco ou nenhum declínio da atividade enzimática quando incubada em líquido ruminal por até 6 h (HRISTOV et al., 1998a). Morgavi et al. (2001) avaliaram a estabilidade de enzimas a proteases ruminais e intestinais. Foram testadas cinco preparações enzimáticas comerciais, em doses baixa e alta, originadas do fungo *Trichoderma longibrachiatum* designadas de A, B, C, D e E. Apesar de ocorrer variabilidade de 20 a 90% da atividade enzimática no rúmen foi demonstrado que todas as preparações foram relativamente estáveis e após 6 horas de incubação, a atividade de celulase do produto B diminuiu 40 e 25% para concentração baixa e alta, respectivamente. A dose alta do produto D diminuiu 60% da sua atividade de celulase após 6 horas de incubação e a atividade de celobiohidrolase diminuiu 40% na preparação B e em até 70% na alta dose da preparação D. A diminuição da atividade diferiu entre os níveis de enzima, com uma diminuição de 80% em nível baixo e de 20 a 30% para nível alto para ambas as preparações. Os autores concluem que os aditivos enzimáticos testados foram relativamente estáveis no fluido ruminal e resistentes à degradação microbiana por um tempo suficientemente para atuar no rúmen. No entanto, a estabilidade variou entre os produtos comerciais e também dependia da dose utilizada.

3.1.8 Sinergismo entre enzimas fibrolíticas exógenas e microrganismos do rúmen

Outro ponto importante para ação das EFE é a ação em conjunto com as enzimas endógenas e como resultado tem-se o aumento da atividade enzimática que excede os efeitos aditivos de cada uma das enzimas individuais, ou seja, elas atuam em sinergia. Morgavi et al.

(2000b) demonstraram sinergismo entre enzimas exógenas e enzimas ruminais. Nesse trabalho quando as enzimas de *Trichoderma longibrachiatum* foram combinadas com enzimas do rúmen extraídas de bovinos recebendo dietas ricas em fibra ou concentrados, a hidrólise de celulose aumentou em 35%, da xilana em 100% e da silagem de milho em 40 %.

3.1.9 Efeito pós-ruminal de enzimas fibrolíticas exógenas

O mecanismo de ação de enzimas em dietas de não-ruminantes propõe a possibilidade de reduções mediadas por enzimas na viscosidade da digesta duodenal poderiam melhorar a absorção de nutrientes no intestino delgado de bovinos. Entretanto, a viscosidade intestinal de bovinos é apenas entre 1 e 2 cPoise (MIR et al., 2000), enquanto a viscosidade intestinal em aves de excede 400 cPoise (BEDFORD, 1993) e uma melhora no desempenho em aves suplementadas com enzimas é geralmente associado com reduções de 10 vezes na viscosidade intestinal (BEDFORD, 1995). Hristov, McAllister e Cheng (2000) conduziram um experimento para determinar se a suplementação de uma preparação de β -glucanase aumentaria a atividade de enzimas que degradam polissacarídeos no duodeno. Esses autores observaram aumento de atividade de celulase, xilanase e amilase além de maiores concentrações de açúcares redutores no duodeno com o aumento do nível de suplementação enzimática e redução de 15% a viscosidade da digesta duodenal quando doses elevadas de enzimas foram administradas, sem, no entanto, afetar a digestibilidade dos nutrientes no trato total. As atividades de celulase, β -glucanase e amilase nas fezes não foram afetadas pela adição de enzimas, mas tendeu a aumentar atividade de xilanase.

As EFE podem ser resistentes a proteases intestinais, Morgavi et al. (2001) demonstraram que a pepsina não influenciou a atividade de EFE em ruminantes. Entretanto, a atividade dessas enzimas exógenas foi menor a medida que se aumentou as concentrações de pancreatina, sendo a celulase e β -glicosidase as enzimas mais atingidas. Os resultados deste estudo sugerem que EFE podem sobreviver no intestino e exercer sua ação em substratos potencialmente disponíveis. O efeito da enzima, embora provavelmente transitória, pode aumentar a hidrólise e reduzir a viscosidade da digesta, principalmente na primeira porção do intestino, quando o pH ainda é abaixo de neutro e próximo do ótimo para enzimas fúngicas (MIR et al., 1997).

3.1.10 Efeito de enzimas fibrolíticas exógenas sobre o metabolismo e produção de leite

Schingoethe, Stegeman e Treacher (1999) avaliaram a suplementação de enzimas com atividades celulase e xilanase sobre o desempenho de vacas leiteiras em meio da lactação. A dieta era composta de 55% forragem (33% de silagem de milho e 22% de feno de alfafa) e 45% de concentrado. Os tratamentos foram: 1) sem enzima (controle); 2) 0,7 L enzima/ton MS de forragem; 3) 1,0 L enzima/ton MS de forragem; 4) 1,5 L de enzima/ton MS de forragem, e 5) Dieta sem aplicação de enzima, com 45% forragem (27% de silagem de milho e 18% de feno de alfafa) e 55% de concentrado. A enzima foi aplicada à forragem imediatamente antes do fornecimento da dieta aos animais. A produção de leite não foi diferente entre os tratamentos. No entanto, a produção de leite corrigido para gordura (LCG 3,5%) e leite corrigido para energia (LCE) foi maior quando as vacas foram alimentadas com dietas tratadas com enzimas (dietas 2 a 4) ou com dieta com mais concentrado (dieta 5) comparadas com a dieta controle (dieta 1). As dietas 3 e 4 tenderam a aumentar a produção de proteína no leite em relação a dieta 2 e as dietas 2, 3, 4 e 5 aumentaram a produção de gordura no leite quando comparado com o controle. Houve tendência para aumento da produção de proteína para os tratamentos 2, 3, 4, e 5 em relação ao controle. Os autores concluem que a suplementação enzimática pode proporcionar ganhos em desempenho na lactação da mesma forma que o aumento na proporção de concentrados na dieta.

Rode, Yang e Beauchemin (1999) em um experimento com 20 vacas em início da lactação avaliaram o efeito da adição de 1,3 g/kg de dieta total de enzima fibrolítica com atividades celulase e xilanase sobre o consumo de matéria seca, digestibilidade e produção de leite. A dieta continha 24% de silagem de milho, 15% de feno de alfafa e 61% de concentrado e a enzima foi aplicada sobre o concentrado. Não houve diferenças no CMS entre os tratamentos. A digestibilidade aparente total da MS, FDN, FDA, PB aumentaram com adição da enzima. A produção de leite tendeu a aumentar (35,9 vs. 39,5 kg/dia), o que pode ter sido consequência do aumento na digestibilidade da MS (61,7 vs. 69,1%) e da matéria orgânica (63,9 vs. 70,6%). A suplementação com a enzima tendeu a aumentar a produção de proteína do leite (3,24 vs. 3,03 kg/dia) e a produção de gordura tendeu a ser menor (1,32 vs. 1,35 kg/dia) nesse mesmo tratamento. Os autores concluíram, nesse trabalho, que a suplementação com enzimas fibrolíticas aplicadas ao concentrado em dietas de vacas leiteiras no início da lactação pode aumentar a digestibilidade e a produção de leite sem interferências no CMS.

Romero et al. (2016) avaliaram a suplementação de EFE sobre o desempenho de vacas leiteiras (experimento 1) e o efeito das enzimas na cinética de degradação ruminal da dieta

(experimento 2). No experimento 1 foram utilizadas 66 vacas em fase inicial da lactação (21 ± 5 DEL) e submetidas aos seguintes tratamentos: 1) controle (CON, sem enzima), 2) xilanase (2A, 1 ml/kg de MS da dieta total) e 3) proporção de 75:25 da mistura de enzimas celulase e xilanase (3A, 3,4 ml/kg de MS da dieta total). As enzimas foram aplicadas na dieta que era composta de 10% de feno de Tifton, 35% de silagem de milho, 5% feno de alfafa e 50% de concentrado (com base na MS). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados com duração de 84 dias, sendo considerado período de covariável os primeiros 14 dias. No segundo experimento avaliou-se a degradação ruminal da MS *in situ* e a fermentação ruminal utilizando como substratos as dietas do experimento 1. Foram utilizadas três vacas em lactação com fistula no rúmen. O delineamento experimental foi do tipo quadrado latino 3 x 3 com períodos de 23 dias. A aplicação da enzima 2A aumentou o CMS (23,5 vs. 22,6 kg/dia), e o consumo de matéria orgânica (CMO) (21,9 vs. 20,9 kg/dia). Houve tendência de aumento na produção de leite corrigido para 3,5% de gordura (41,8 vs. 40,7 kg/dia) e gordura do leite (1,48 vs. 1,44 kg/dia), para o tratamento 2A. A cinética de degradação ruminal, o pH, o teor de N-NH₃, e a concentração de AGV não foram afetados pelos tratamentos. Não houve influência dos tratamentos sobre as concentrações plasmáticas de glicose e de nitrogênio. Os autores concluíram que a suplementação de EFE aumentou o CMS e que preparações enzimáticas à base de celulase e xilanase podem afetar de forma positiva o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com fonte majoritária de forragem na dieta de silagem de milho e até 10% de Tifton como % da MS, mais precisamente nesse estudo, a enzima 2A mostrou-se ser mais promissora.

A proporção entre forragens e concentrado na dieta de vacas leiteiras também pode influenciar as respostas da suplementação de enzimas fibrolíticas na dieta. Arriola et al. (2011) desenvolveram um estudo para testar dois níveis de concentrados na dieta juntamente com a aplicação ou não de enzima com atividades celulase, xilanase sobre o desempenho de vacas leiteiras em início de lactação. Foram utilizadas sessenta vacas Holandês (22 ± 3 DEL), em arranjo fatorial 2 x 2, atribuídas aos seguintes tratamentos: 1) dieta com baixo concentrado sem enzima (BC; 67:33 forragem/concentrado); 2) BC com enzima (BCE); 3) dieta com alto concentrado (AC; 52:48 forragem/concentrado); e 4) AC com enzima (ACE). A enzima foi aplicada a uma taxa de 3,4 kg/ton de MS da dieta. A porção de forragem da dieta era composta por 20% de feno de alfafa, 72% de silagem de milho e 8% caroço de algodão (com base na MS). A aplicação da enzima não afetou o CMS mas tendeu a reduzir os consumos de PB (4,5 vs. 4,2 kg/d), FDN (7,9 vs. 7,4 kg/d) e FDA (5,3 vs. 4,9 kg/d). Houve aumento da digestibilidade da MS (69,8 vs. 72,6%), PB (69,2 vs. 73,3%), FDA (50,4 vs. 54,8%) e FDN (53,7 vs 55,4%) para as dietas tratadas com a enzima. Os autores sugerem que esse ganho em digestibilidade

pode ter ocorrido devido a melhor colonização microbiana às partículas de alimentos e/ou por hidrólise da parede celular. Houve interação entre a aplicação de enzima e a quantidade de concentrado na dieta. Nos tratamentos com baixo concentrado a aplicação da enzima proporcionou maior eficiência de produção de leite (1,46 vs. 1,69 LCG3,5%/CMS), o que não ocorreu nas dietas com proporção maior de concentrado. Esses resultados sugerem que a adição de enzimas em dietas com maiores proporções de forragem pode ser utilizada para alimentar vacas leiteiras sem que ocorra comprometimento da produção de leite, e isso poderia reduzir o custo da dieta e o risco de acidose. Nesse mesmo trabalho aplicação de enzima tendeu a reduzir a proporção acetato (58,9 vs. 56,0 %), mas não houve mudanças na proporção de propionato ou na concentração de amônia. Consequentemente, a aplicação de enzimas reduziu a relação acetato/propionato (3,09 vs. 2,87), implicando em maior eficiência na utilização de energia pelo rúmen. Isso está de acordo com o fato de que a adição de enzimas diminuiu a proporção de metano produzido no rúmen. Segundo os autores a aplicação de uma enzima fibrolíticas em dietas com baixo concentrado pode ter o mesmo desempenho de uma dieta com alto concentrado não tratada com enzima.

A suplementação com enzimas fibrolíticas nem sempre proporcionam efeitos no desempenho de vacas leiteiras, como produção e composição do leite. Peters et al. (2010) avaliaram a suplementação com enzimas fibrolíticas com atividades celulase e xilanase sobre o desempenho de vacas leiteiras. Foram utilizadas seis vacas Holandês, que possuíam cânulas no rúmen e no duodeno, com 98 ± 29 DEL, e com produção de leite de $32,4 \pm 3,5$ kg/dia. A dieta continha 30% silagem de milho, 20% silagem de capim e 50% concentrado (com base na MS). O delineamento experimental utilizado foi do tipo *cross-over*, com três períodos de 28 dias cada. Os tratamentos foram: 1) sem enzima (controle) e 2) com enzima (6,2 ml/kg MS da dieta). A proporção de acetato tendeu a ser menor (64,7 vs. 60,9%) quando houve suplementação enzimática. Entretanto a relação acetato/propionato não foi diferente. A adição da enzima não afetou o pH, N-NH₃, fluxo de nitrogênio microbiano para o duodeno, e também não houve melhora na eficiência de síntese de proteína microbiana. Não houve diferença no CMS, digestibilidade aparente ruminal e total da MS, MO, FDN, FDA e a produção e composição do leite também não foram afetadas.

Silva et al. (2016) realizaram um experimento para avaliar níveis crescentes de EFE com atividade xilanase em dietas sobre o comportamento ingestivo de vacas leiteiras em estágio médio da lactação. Vinte e quatro vacas Holandês ($33,72 \pm 7,63$ kg leite/dia e $176 \pm 82,27$ DEL) foram distribuídas em um delineamento experimental quadrado latino 4 x 4 com período de 21 dias. As doses de enzimas utilizadas foram: 0, 8, 16 ou 24 g/d por vaca, e foram fornecidas

diariamente na forma de pó misturado ao concentrado antes de cada fornecimento da dieta total que continha 50% de silagem de milho e 50% de concentrado. A produção e a composição do leite não foram afetadas pelos tratamentos. Entretanto, houve tendência de efeito quadrático para a produção de proteína. Em relação à eficiência de N para produção de leite houve efeito linear com a suplementação de enzimas. Comportamento quadrático em relação à concentração ruminal de N-NH₃. A relação acetato/propionato, a proporção de propionato e butirato no rúmen apresentaram efeito quadrático pelas doses de fornecimento de EFE.

A utilização de enzimas fibrolíticas exógenas pode ser uma estratégia nutricional para maximizar a eficiência do uso de forragens. Nesse sentido Yang et al. (2019) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi avaliar os efeitos da suplementação de xilanase sobre o desempenho, digestibilidade de nutrientes e perfil de ácidos graxos do leite em vacas leiteiras de alta produção. O delineamento experimental foi do tipo quadrado latino 4 x 4, com períodos de 19 dias e foram utilizadas 24 vacas Holandês (49 ± 14 DEL) alimentadas com dieta composta de 32% de silagem de milho ou silagem de sorgo, 8% de feno de capim e 60% de concentrado. Os tratamentos consistiram em: 1) Dieta com silagem de milho sem xilanase; 2) Dieta com silagem de milho com xilanase; 3) dieta com silagem de sorgo sem xilanase; e 4) dieta com silagem de sorgo com xilanase. A enzima foi aplicada a uma taxa de 1,5 g/kg de MS da dieta total. Esta enzima é uma endo-1,4- β -xilanase de *Aspergillus oryzae* sem atividades celulósicas ou proteolíticas (RYCHEN et al., 2017) e atividade máxima em torno de pH 5. A suplementação com xilanase não afetou o CMS, e nem a composição do leite. Além disso, nenhuma das interações entre suplementação com xilanase e tipo de silagem foram significativas para qualquer uma dessas variáveis. Não houve efeito da enzima sobre o perfil de ácidos graxos do leite.

Kung Júnior et al. (2002) utilizaram 30 vacas Holandês (93 ± 47 DEL) com média de produção de 40 kg/dia alimentadas com uma TMR composta de 30% de silagem de milho, 15% de feno de alfafa e 55% de concentrado para avaliar os efeitos da suplementação enzimática sobre o desempenho e digestibilidade dos nutrientes. O delineamento utilizado foi o contínuo constando de 14 dias de covariável e 12 semanas de avaliação. Os tratamentos foram: 1) sem enzimas (CTL); 2) complexo de celulase D e complexo xilanase B (DB, 3400 unidades de celulase e 10.450 unidades de xilanase/kg de MS de forragem); e 3) complexo de celulase D e complexo de xilanase C (DC, 3350 unidades de celulase e 10.500 xilanase/kg de MS de forragem). Os tratamentos não afetaram o CMS (26,9, 27,8 e 27,2 kg/dia, para controle, DB e DC, respectivamente). Entretanto, a produção de leite corrigido para 3,5% de gordura tendeu a ser maior para o tratamento DB tanto em relação ao controle quanto ao DC (38.5 vs. 36.0 kg/dia,

para DB e CTL, respectivamente; $P = 0,08$, 38,5 vs. 35,7 kg/dia, para BD e DC, respectivamente). A eficiência alimentar e o peso vivo dos animais não foram alterados.

Kung Júnior et al. (2000) utilizaram 30 vacas Holandês em lactação (100 ± 45 DEL), em delineamento contínuo com 14 dias de covariável e 12 semanas de avaliação, alimentadas com dieta composta por 45% de silagem de milho, 5% de feno de alfafa e 50% de concentrado. Os tratamentos foram: 1) sem enzima, CTL; 2) celulase e xilanase ENZ2 (3500 unidades de celulase / kg de MS de forragem e 16.000 unidades de xilanase / kg de MS de forragem; e 3) celulase e xilanase, ENZ3 (8800 unidades de celulase/kg de MS de forragem e 40.000 unidades de xilanase/kg de MS de forragem. Enzimas foram derivadas do fungo *Trichoderma longibrachiatum* e aplicadas imediatamente antes do fornecimento da dieta aos animais. O CMS não foi alterado pelos tratamentos. Entretanto, a produção de leite tendeu a ser maior (37,0, 39,5 e 36,2 kg/dia, para CTL, ENZ2 e ENZ3, respectivamente) para o tratamento ENZ2 em relação ao CTL e ENZ3. Também houve tendência para eficiência alimentar (LCG/CMS) para ENZ2 em relação a ENZ3 (1,53 vs. 1,44), sem diferença do CTL (1,53 vs. 1,47). O tratamento ENZ2 proporcionou maiores produções de proteína (1,25 vs. 1,08 kg/dia) e gordura do leite (1,13 vs. 0,92 kg/dia) que o tratamento ENZ3.

Bassiouni et al. (2010) investigaram a suplementação de EFE com atividade de xilanase (100 unidades de xilanase/g) na taxa de 1 g/kg de MS de forragem para vacas leiteiras em início de lactação. A suplementação enzimática tendeu a aumentar o consumo de nutrientes digestíveis totais ($P = 0,06$, 10,5 vs. 9,7 kg/dia) e aumentou a digestibilidade da MS (66,6 vs. 62,5%) e da MO (70,8 vs. 66,4%). A produção de leite (17,0 vs. 15,7 kg/dia) e o teor de gordura do leite (3,58 vs. 3,46%) também foram melhorados pelo fornecimento de enzima. A concentração total de AGV foi maior (16,0 vs. 14,4 meq/100 ml) e a concentração de N-NH₃ foi menor (13,0 vs. 14,4 mg/100 ml) com a suplementação de enzimas.

Mohamed et al. (2013) avaliaram a suplementação com uma preparação enzimática com atividade de xilanase no desempenho de vacas leiteiras em início de lactação ($57 \pm 4,2$ DEL) em delineamento contínuo por 12 semanas. A dieta era composta por 10,7% de feno de alfafa, 7,3% de trevo verde 26,0% de silagem de milho e 56% de concentrados, e as vacas que foram suplementadas com a enzima receberam diariamente 15 g/vaca do produto comercial que é proveniente do extrato da fermentação de *Aspergillus Niger* e *Trichoderma longibrachiatum*. Não houve diferenças significativas no CMS entre os tratamentos. Entretanto a suplementação com enzimas aumentou a produção de leite (41,0 vs. 39,5 kg/dia) e a eficiência alimentar (1,64 vs. 1,58). Com relação aos constituintes do leite a suplementação com enzima também

proporcionou maiores produções de proteína (1,30 vs. 1,36 kg/dia) e lactose (1,92 vs. 2,0 kg/dia), sem afetar a produção de gordura (1,34 vs. 1,36 kg/dia).

El-Bordney et al. (2015) avaliaram a suplementação de uma preparação enzimática de xilanase e celulase sobre o desempenho de vacas leiteiras. As vacas suplementadas com EFE apresentaram maior produção de leite em relação ao controle (25,2 vs. 28,0 kg/dia). A mesma tendência foi observada para o teor de gordura do leite (3,52 vs. 3,84%), produção de gordura do leite (837,1 vs. 1077,7 g/dia) e também de produção de proteína do leite (766,5 vs. 875,6 g/dia). A suplementação com enzima aumentou as concentrações plasmáticas de proteína total (7.87 vs. 8.83 g/dL) e de glicose (42,42 vs. 49,89 mg/dL) em relação ao controle.

Adição de enzimas fibrolíticas exógenas à dieta de vacas leiteira dietas tem potencial em aumentar a digestibilidade dos nutrientes e melhorar eficiência da utilização dos alimentos pelos ruminantes. Respostas positivas na produção de leite são observadas embora as respostas tenham sido inconsistentes e parte da variação pode ser atribuída à formulação ao produto, atividade e doses de suplementação de enzimas, método inadequado de fornecer a produto enzimático para o animal.

3.2 Deterioração aeróbia de alimentos úmidos

A estabilidade aeróbia é designada como o período em que a silagem ou a TMR excede 2°C da temperatura ambiente, ou seja, permanece estável com pouco ou nenhum desenvolvimento de microrganismos deterioradores com conseqüente produção de calor e aquecimento do alimento. Quando silagens são expostas ao oxigênio (O₂), o ácido lático é oxidado pelos microrganismos em ácido acético, dióxido de carbono (CO₂), e água, gerando calor e aumento do pH, que proporciona um ambiente adequado para o desenvolvimento de outros microrganismos, tais como, fungos filamentosos, bacilos, listeria, clostrídeos e enterobactérias (TABACCO et al., 2009). Os fungos, em particular as leveduras, são geralmente responsáveis pelo início da deterioração aeróbia (WOOLFORD, 1990), embora os bacilos e as bactérias ácido acéticas possam iniciar o processo de deterioração (PAHLOW et al., 2003; SPOELSTRA; COURTIN; VAN BEERS, 1988).

O desenvolvimento de fungos filamentosos acontece em sequência ao desenvolvimento das leveduras (McDONALD; HENDERSON; HERON, 1991). As perdas de MS podem exceder 20% quando a contagem fungos filamentosos são superiores a 5 ufc/g, e 40% se a contagem for acima de 6 ufc/g de silagem. Além disso, contagem de fungos filamentosos acima de 5 ufc/g em silagens está associado a mudanças substanciais na qualidade nutricional deste alimento, com início da diminuição do teor de amido (BORREANI et al., 2018). Fungos visíveis

na silagem subestimam áreas circundantes muito maiores, sendo que estas podem conter micélio invisível, bem como a ocorrência de micotoxinas (PAHLOW et al., 2003). A forma e a extensão pelo qual ocorre a deterioração da silagem, quando esta é exposta ao O₂, depende principalmente da interação entre bactérias e fungos que já estão presentes na cultura, das características químicas e físicas do alimento e das condições do ambiente. Estes fatores são influenciados pelo manejo de confecção e de uso da silagem.

A estabilidade aeróbia de silagens e dos ingredientes utilizados na confecção da dieta determina a estabilidade da TMR no cocho. Com o desenvolvimento dos microrganismos na TMR ocorre a produção de calor e conseqüentemente aquecimento desta no cocho, podendo esse processo ocorrer dentro de poucas horas a partir da homogeneização dos ingredientes, gerando conseqüências negativas como a oxidação de nutrientes e perda de MS, queda no CMS dos animais provocando redução do desempenho e da produção de leite. Seppälä et al. (2013) observaram maior estabilidade da TMR quando essas foram confeccionadas com silagens que continham contagem de leveduras menor que 2 ufc/g em relação a uma TMR preparada com silagem com leveduras > 5,0 ufc/g. As silagens são frequentemente misturadas com alimentos concentrados imediatamente antes da alimentação dos animais, expondo totalmente a silagem em contato com o oxigênio, além de potencialmente fornecer mais substrato aos microrganismos já presentes na silagem, o que pode comprometer a estabilidade aeróbia da TMR no cocho.

Diante da impossibilidade de controlar a temperatura ambiente em condições de campo juntamente com a característica da silagem de milho ou silagem de sorgo que apresentam altas concentrações de substratos potencialmente oxidáveis por microrganismos oportunistas, que acarreta maior instabilidade aeróbia na fase de utilização para alimentação dos animais (SIQUEIRA; BERNARDES; REIS, 2005) tornam-se imprescindíveis estratégias de manejo, como aplicação de ácidos orgânicos, a fim de reduzir as chances do desenvolvimento dos microrganismos deterioradores na TMR.

3.2.1 Propriedades dos ácidos orgânicos

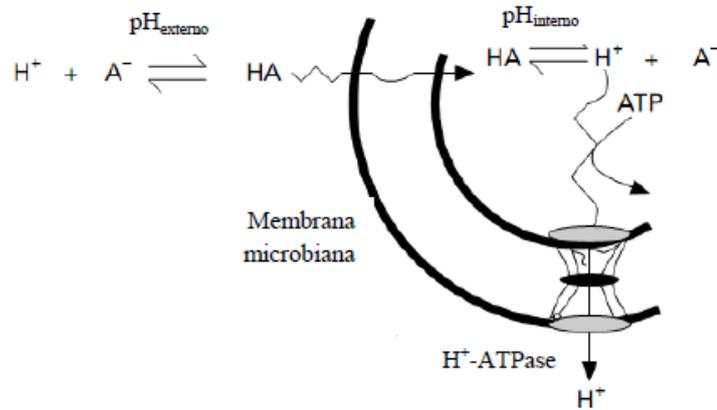
O que caracteriza uma substância como ácido orgânico é a presença de um átomo de hidrogênio positivamente polarizado, ácidos são moléculas doadoras de próton enquanto as bases são receptoras. Um doador de prótons e o seu receptor correspondente formam o que se denomina par ácido-base conjugado. Os ácidos fracos são aqueles que não se ionizam completamente quando dissolvidos em água, são comuns em sistemas biológicos e apresentam papel importante no metabolismo e sua regulação.

Os ácidos orgânicos são constituintes naturais das plantas e animais. Alguns podem ser formados através da fermentação microbiológica no intestino e outros nas rotas metabólicas intermediárias (LEGNINGER; NELSON; COX, 1993). Como grupo químico, os ácidos orgânicos são considerados como sendo qualquer substância de estrutura geral (R-COOH), gerando grupos de compostos relacionados, conhecidos como derivados dos ácidos carboxílicos, como os aminoácidos, os ácidos graxos, coenzimas e metabólitos intermediários (SOLOMON et al., 2003). Nem todos apresentam atividade antimicrobiana, os ácidos de cadeia curta (de 1 a 7 átomos de carbono) são os que possuem efeitos antimicrobianos, como por exemplo o fórmico, acético, propiônico, butírico, láctico, málico, tartárico e o cítrico.

Os ácidos orgânicos exercem efeitos antimicrobianos de formas distintas. Primeiro devido à redução do pH do meio externo e, segundo, devido à ação da sua forma não dissociada. Todos os microrganismos apresentam uma faixa de pH ótima para se desenvolver. Todavia, o pH do meio intracelular se aproxima da neutralidade, inclusive nos organismos acidófilos, aqueles que se desenvolvem em ambientes ácidos. A manutenção do pH intracelular ocorre mediante mecanismos de homeostase (BOOTH, 1985).

O efeito antimicrobiano dos ácidos orgânicos ocorre principalmente pela ação da forma não dissociada, que é solúvel em lipídeos e consegue atravessar a membrana celular por transporte passivo, ou seja, sem gasto de energia. Dentro da célula microbiana a molécula do ácido orgânico se dissocia, alterando o pH citoplasmático e o metabolismo celular. Com intuito de normalizar o pH ocorre alteração no gradiente de prótons e cargas no meio intracelular, interferência no sistema de transporte de aminoácidos e fosfatos, e ainda inativação de enzimas. Concomitantemente ocorre o aumento da pressão osmótica da célula, que desencadeia mecanismos de compensação de carga elétrica obrigando o aumento dos níveis de sódio, potássio ou glutamato, levando ao aumento da força iônica intracelular, provocando um aumento da pressão mecânica sobre a parede do microrganismo, o que faz com que essa se rompa (RUSSEL, 1992).

Figura 2 - Mecanismo de ação de ácidos fracos na forma não dissociada na célula microbiana.



Fonte: Booth (1985).

Dependendo da taxa de aplicação e do poder de tamponamento dos ácidos eles podem provocar uma acidificação direta e supressão de bactérias indesejadas (BORREANI et al., 2018). Os ácidos sórbico, benzoico, propiônico e acético inibem o desenvolvimento de leveduras e fungos filamentosos quando as silagens são expostas ao oxigênio (AUERBACH; NADEU, 2013). O ácido sórbico também pode inibir o desenvolvimento de algumas bactérias, como as do gênero *Clostridium* (WOOLFORD, 1975).

O ácido sórbico é o ácido mais potente inibidor de leveduras, fungos filamentosos e bactérias deteriorantes em relação ao ácido benzoico (BERNARDES et al., 2014; BORREANI et al., 2018), atribuída principalmente à sua maior constante de dissociação ácida (4,75) em relação ao ácido benzoico (4,20), pois os ácidos podem diferir em seus efeitos inibitórios no mesmo pH (AUERBACH, 1996). Os sais benzoato de sódio, sorbato potássio, propionato de amônio, propionato de cálcio, propionato de sódio e acetato de sódio inibem leveduras e fungos filamentosos melhorando assim a estabilidade aeróbia de silagens (AUERBACH; WEISS, 2012; BORREANI et al., 2018). Para que sejam obtidos resultados consistentes em reduzir o desenvolvimento de microrganismos deterioradores e prolongar a qualidade do material conservado geralmente aditivos comerciais são baseados em uma combinação desses ingredientes ativos em concentrações variadas.

3.2.2 Ácidos orgânicos como controladores da deterioração aeróbia

O desenvolvimento de microrganismos na TMR causa deterioração dos nutrientes e o aquecimento dos alimentos no cocho e isso é relativamente um problema comum em fazendas, principalmente aquelas situadas em ambientes de altas temperaturas. Para evitar as consequências negativas da deterioração aeróbia, novos lotes de TMR podem ser preparados

em intervalos mais curtos e as sobras, que são alimento que ainda poderá ser consumido, podem necessitar serem removidas implicando em gasto de tempo e mão de obra além da perda de alimento, o que pode reduzir a eficiência do sistema de produção.

Quando uma mistura de alimentos (49,8% de cevada, 12,0% de farelo de soja, 10,0% de bagaço de palma, 12,5% de polpa cítrica, 8,0% de glúten de milho, 5,0% de melado, e 2,5% de pré-mistura mineral e vitamínica,) foi homogeneizada com dez tipos diferentes de silagens de gramíneas não foi observado influência destes ingredientes na estabilidade aeróbia das silagens, mas uma vez iniciada a deterioração aeróbia, os ingredientes foram capazes de intensificar e acelerar o processo de deterioração diante da disponibilidade de substratos (O'KIELY, 2007). Seppala et al. (2013) avaliaram a influência da qualidade higiênica das matérias-primas e da aplicação de aditivos químicos na estabilidade aeróbia da TMR à base de silagem de capim. Os tratamentos foram: 1) TMR confeccionada com ingredientes e silagem de fresca de boa qualidade, e 2) TMR confeccionada com adição de 10% de uma TMR deteriorada. A contagem de leveduras nessas silagens foram: < 2,0 e 5,87 ufc/g. Os aditivos na forma líquida (ácido propiônico, propionato de amônio, ácido fórmico e formato de amônio) ou sólido (propionato de cálcio e propionato de sódio) foram aplicados no momento da mistura da TMR em 0, 2 e 3 g/kg de MN. A estabilidade aeróbia do tratamento que continha a silagem deteriorada foi apenas de 7 h, ou seja, 12 % do total de estabilidade aeróbia alcançada pela TMR confeccionada com a silagem de boa qualidade. O aditivo químico melhorou discretamente a estabilidade aeróbia das dietas e não houve diferenças entre as doses testadas.

Em uma segunda avaliação Seppala et al. (2013) avaliaram quatro TMR's homogeneizadas com os seguintes ingredientes (base na MS): 1) 48,7% de silagem de boa qualidade, 14,3% bagaço de colza, 13,1% de cevada e 23,9% de concentrados (misturados em escala comercial); 2) 48,7 % de silagem de boa qualidade, 14,3% bagaço de colza, 13,1% de cevada e 23,9% de concentrados (teste em laboratório) 3) 26,3% silagem de boa qualidade, 26,3% de silagem deteriorada, 13,3% de bagaço de colza, 22,2% de concentrado, 11,9% cevada; e (teste em laboratório) 4) 56,0% silagem de boa qualidade, 16,5% de bagaço de colza e 27,5% de concentrados (teste em laboratório). O aditivo líquido (ácido propiônico, propionato de amônio, ácido fórmico e formato de amônio) foi utilizado nas doses 2, 4 e 6 g/kg de MN e o sólido (propionato de cálcio e sódio) à 4 g/kg de MN e aplicados no momento da confecção das TMR's. Os ingredientes também foram analisados quanto a contagem de bactérias aeróbias, leveduras e fungos filamentosos. A cevada e a silagem deteriorada apresentaram maior número de bactérias aeróbias e leveduras em relação aos outros ingredientes (silagem deteriorada: 9,78 e 5,87 ufc/g de bactérias aeróbias e leveduras, respectivamente; cevada: 8,66 e 6,62 ufc/g de

bactérias aeróbias e leveduras, respectivamente) o que evidentemente refletiu na contagem microbiana inicial e na estabilidade aeróbia das TMR's. O aditivo líquido apresentou comportamento linear de 20,0, 38,5 e 43,3% sob a melhora da estabilidade aeróbia das TMR's 1, 2 e 3 respectivamente, em relação ao controle. E não houve influência na estabilidade aeróbia da TMR 4. Já o aditivo sólido foi capaz de melhorar a estabilidade das dietas em aproximadamente 20%, sem diferenças estatísticas entre as formas líquida ou sólida dos aditivos. A estabilidade aeróbia da TMR está diretamente correlacionada com a qualidade higiênica dos ingredientes. Os aditivos a base de ácido propiônico, fórmico e formato de amônio foram capazes de prolongar a estabilidade das dietas nesse caso.

Os resultados descritos acima sugerem que adicionar alimentos ricos em energia ou proteína em silagens não impacta de modo direto na estabilidade aeróbia da mistura, mas tem efeito na extensão da deterioração quando a estabilidade é rompida o que está diretamente correlacionado com a qualidade e estabilidade da silagem produzida e dos ingredientes utilizados no preparo da TMR. Portanto, estratégias que visam evitar o início da deterioração aeróbia das silagens é pertinente e o uso de aditivos químicos tem-se mostrado promissor em melhorar a estabilidade da TMR no cocho.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T. et al. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1317-1330, Mar. 2014.
- ADESOGAN, A. T. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 91., 2005, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2005. p. 91-109.
- AHMED, A. et al. Microbial β -glucosidase: sources, production and applications. **Journal of Applied & Environmental Microbiology**, Newark, v. 5, p. 31-46, Jan. 2017.
- AMORE, A.; GIACOBBE, S.; FARACO, V. Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. **Current Genomics**, Hilversum, v. 14, n. 4, p. 230-249, June 2013.
- ANDRIC, P. et al. Reactor desing for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I., significance and mezhanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 308-324, May 2010.
- ARRIOLA, K. G. et al. A meta-analysis on the effecer of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 100, n. 6, p. 4513-4527, June 2017.
- ARRIOLA, K. G.; ROMERO, J. J.; ADESOGAN, A. T. Effects of pH and temperature on fibrolytic enzyme activities of various commercial exogenous enzyme preparations. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, Suppl. 1, p. 554, 2011.
- AUERBACH, H. Technological measures to minimize the risk of the contamination of silages with *Penicillium roqueforti* and its mycotoxins. **Landbauforschung Volkenrode**, Braunschweig, v. 168, p. 1-167, 1996.
- AUERBACH, H.; NADEAU, E. Effects of chemical additives on whole-crop maize silage traits. In: INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS, 22., 2013, Sidney. **Proceedings...** Sidney: New South Wales Department of Primary Industry, 2013. p. 736-737.
- AUERBACH, H.; WEISS, K. The effect of different types of silage additives on dry matter losses, fermentation pattern, volatile organic compounds and aerobic stability of sorghum silage. In: INTERNATIONAL SILAGE CONFERENCE, 21., 2012, Hämeenlinna. **Proceedings...** Hämeenlinna: [s.n.], 2012. p. 418-419.
- BANSAL, N. et al. Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. **Waste Management**, Elmsford, v. 32, n. 7, p. 1341-1346, July 2012.
- BASSIOUNI, M. I. et al. Evaluation of rations supplemented with fibrolytic enzyme on dairy cows performance 3. Productive performance of lactating Friesian cows. **Livestock Research for Rural Development**, Cali, v. 22, n. 6, June 2010. Disponível em: <<http://www.lrrd.org/lrrd22/6/bass22117.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2020.

- BAYER, E. A. et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes. **Current Opinion in Structural Biology**, London, v. 8, n. 5, p. 548-557, Oct. 1998.
- BEAUCHEMIN, K. A. et al. Evaluation of a nonstarch polysaccharidase feed enzyme in dairy cow diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 3, p. 543-553, Mar. 2000.
- BEAUCHEMIN, K. A.; RODE, L. M.; SEWALT, J. H. Fibrolytic enzymes increase fiber digestibility and growth rate of steers fed dry forages. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 75, p. 641-644, 1995.
- BEAUCHEMIN, K. A.; YANG, W. Z.; RODE, L. M. Effects of particle size of alfalfa-based dairy cow diets on chewing activity, ruminal fermentation, and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 630-643, Feb. 2003.
- BEDFORD, M. R. Mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, v. 53, n. 1, p. 145-155, June 1995.
- BERNARDES, T. F. et al. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass Forage Science**, Oxford, v. 70, n. 3, p. 491-498, Sept. 2014.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.
- BHAT, M. K.; HAZLEWOOD, G. P. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. In: BEDFORD, M.; PARTRIDGE, G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Bradford: CABI, 2001. p. 11-57.
- BONFIM K, S. et al. Comparação da síntese de celulases pelos fungos *Trichoderma reesei* e o FSDE15. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2015, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: Blucher Chemical Engineering Proceedings, 2015. p. 313-319.
- BOOTH, I. R. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 49, n. 4, p. 359-378, Dec. 1985.
- BORREANI, G. et al. Silage review: factors affecting dry matter and quality losses in silages. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, n. 5, p. 3952-3979, May 2018.
- BOWMAN, G. R.; BEAUCHEMIN, K. A.; SHELFORD, J. A. The proportion of feed to which a fibrolytic enzyme additive is applied affects nutrient digestion by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3420-3429, 2002.
- CAO, Y.; TAN, H. Effects of cellulase on the modification of cellulose. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 337, n. 14, p. 1291-1296, Aug. 2002.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA, N. J. Production, properties and application of cellulases in the hydrolysis of agroindustrial wastes. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CHESSON, A.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. London: Springer, 1997. p. 251-284.

CHUNG, Y. H. et al. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets: Ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric emissions. **Journal Dairy Science**, Champaign, v. 95, n. 3, p. 1419-1427, Mar. 2012.

COLOMBATTO, D. et al. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 10, p. 2617-2627, Oct. 2003b.

COLOMBATTO, D.; BEAUCHEMIN, K. A. A proposed methodology to standardize the determination of enzymatic activities present in enzyme additives used in ruminant diets. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 83, n. 3, p. 559-568, 2003.

CORADETTI, S. T. et al. Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, Washington, v. 109, n. 19, p. 7397-7402, May 2012.

COWAN, W. D. Factors affecting the manufacture, distribution, application and overall quality of enzymes in poultry feeds. In: INTERNATIONAL ROUNDTABLE ON ANIMAL FEED BIOTECHNOLOGY-PROBIOTICS, AND WORKSHOP ON ANIMAL, FEED ENZYMES, 2., 1994, Ottawa. **Proceedings...** Ottawa: [s.n.], 1994. p. 175-184.

DANIEL, J. L. P. et al. Effects of maturity at ensiling of bermudagrass and fibrolytic enzyme application on the performance of early-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 12, p. 9716-9723, Dec. 2016.

DASHTBAN, M.; BUCHKOWSKI, R.; QIN, W. Effect of different carbon sources on cellulose production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. **International Journal of Biochemistry & Molecular Biology**, Madison, v. 2, n. 3, p. 274-286, Sept. 2011.

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

DEHGHANI, M. et al. Effects of fibrolytic enzyme on milk yield, blood metabolites, rumen microbial growth and pH of Holstein cows in early lactation. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 23, p. 3048-3052, Jan. 2011.

DIAS JÚNIOR, G. S. **Processamento de silagem de milho e suplementação de vacas leiteiras com enzimas fibrolíticas**. 2016. 179 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

DIENES, D.; EGYHÁZI, A.; RÉCZEY, K. Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 20, n. 1, p. 11-21, July 2004.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado**. 2010. 30

p. Tese (Doutorado em Biociências, Letras e Ciências Exatas) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2010.

EL-BORDENY, N. E. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on productive response of dairy cows at different lactation stages. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 5, p. 226-236, May 2015.

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

FENG, P. et al. Effect of enzyme preparations on in situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 6, p. 1349-1357, June 1996.

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

FORSBERG, C. W.; FORANO, E.; CHESSON, A. Microbial adherence to the plant cell wall and enzymatic hydrolysis. In: CRONJE, P. B. (Ed.). **Ruminant physiology: Digestion, metabolism, growth and reproduction**. Wallingford: CABI, 2000. p. 79-97.

GADO, H. M. et al. Influence of exogenous enzymes on nutrient digestibility, extent of ruminal fermentation as well as milk production and composition in dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, v. 154, n. 1-2, p. 36-46, Oct. 2009.

GANDRA, J. R. et al. Fibrolytic enzyme supplementation through ruminal bolus on eating behavior, nutrient digestibility and ruminal fermentation in Jersey heifers fed either corn silage or sugarcane silage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, v. 231, p. 29-37, 2017.

GAO, J. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus terreus* M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, Barking, v. 99, n. 16, p. 7623-7629, Nov. 2008.

GERMANO, S. et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium sp.* produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova York, v. 32, n. 2, p. 246-251, Feb. 2003.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, p. 257-268, 1987.

GLASS, N. L. et al. Plant cell wall deconstruction by ascomycete fungi. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GLUSKER, J. P. **Encyclopedia of inorganic and bioinorganic chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2011. Website.

- HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, London, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, Sept. 2015.
- HARRIS, P. V. et al. Stimulation of lignocellulosic biomass hydrolysis by proteins of glycoside hydrolase family 61: structure and function of a large, enigmatic family. **Biochemistry**, v. 49, n. 15, p. 3305-3316, 2010.
- HOLTSHAUSEN, L. et al. Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of a developmental fibrolytic enzyme additive. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 94, n. 15, p. 899-907, 2011.
- HRISTOV, A. N. et al. Effect of a commercial enzyme preparation on barley silage *in vitro* and *in sacco* dry matter degradability. **Proceedings of the Western Section American Society of Animal Science**, Dakota, v. 47, p. 282-284, 1996.
- HRISTOV, A. N.; MCALLISTER, T. A.; CHENG, K.-J. Intraruminal supplementation with increasing levels of exogenous polysaccharide-degrading enzymes: effects on nutrient digestion in cattle fed and barley grain diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 2, p. 477-487, Feb. 2000.
- ILLANES, A. (Ed.). **Enzyme biocatalysis: principles and applications**. Chile: Springer, 2008. 392 p.
- JURKOVICH, V. et al. Effect of a non-starch polysaccharides enzyme preparation from *Thermomyces lanuginosus* on energy and protein metabolism and milk yield of dairy cattle. **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v. 50, n. 4, p. 395-411, 2002.
- KACHLISHVILI, E. et al. Effect of nitrogen source on lignocellulolytic enzyme production by white-rot basidiomycetes under solid-state cultivation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 22, p. 391-397, 2006.
- KNOWLTON, K. F.; MCKINNEY, J. M.; COOB, C. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 12, p. 3328-3335, Dec. 2002.
- KOPECNY, J.; MAROUNEK, M.; HOLUB, K. Testing the suitability of the addition of *Trichoderma viride* cellulases to feed rations for ruminants. **Zivocisna Vyroba**, Praha, v. 32, p. 587-592, 1987.
- KRAUSE, M. et al. Fibrolytic enzyme treatment of barley grain and source of forage in high-grain diets fed to growing cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 11, p. 1010-1015, Nov. 1998.
- KRUEGER, N. A.; ADESOGAN, A. T. Effects of different mixtures of fibrolytic enzymes on digestion and fermentation and fermentation of bahiagrass hay. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, v. 145, n. 1/4, p. 84-94, Aug. 2008.

- KUNG JÚNIOR, L. et al. The effect of fibrolytic enzymes sprayed onto forages and fed in a total mixed ration to lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 9, p. 2396-2402, Sept. 2002.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 56, n. 24, p. 1-24, 1997.
- LEE, R. W.; BOTTS, R. L. Evaluation of a single oral dosing and continuous feeding of *Streptococcus faecium* M74 (Syntabac) on the performance of incoming feedlot cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 66, Suppl. 1, p. 460, 1998.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Savier, 1998. 839 p.
- LEWIS, G. E. et al. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 3, p. 611-617, Mar. 1999.
- LIU, D. et al. Secretome diversity and quantitative analysis of cellulolytic *Aspergillus fumigatus* Z5 in the presence of different carbon sources. **Biotechnology for Biofuels**, London, v. 6, n. 1, p. 149, Oct. 2013.
- LYND, L. R. et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 66, p. 506-577, 2002.
- MARTINS, A. D. et al. *In situ* degradability and microscopical observations of roughages in cattle supplemented with exogenous fibrolytic enzymes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, n. 6, p. 1927-1936, nov/dez. 2007.
- MARTINS, et al. Degradação ruminal da silagem de milho e da palha de arroz utilizando enzimas fibrolíticas exógenas. **Acta Scientiarum Animal Sciences**. Maringá, v. 30, n.4, p. 435-442, 2008.
- McALLISTER, T. A. et al. Enzymes in ruminant diets. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. Wiltshire: CABI, 2001. p. 273-298.
- McDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. **The biochemistry of silage**. 2. ed. Marlow: Chalcombe, 1991. 340 p.
- MERTENS, D.R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p.1548-1558, 1987.
- MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, p. 1463-1481, 1997.
- MIR, P. S. et al. Activity of intestinal mucosal membrane carbohydrates in cattle of different breeds. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 77, n. 3, p. 441-446, 1997.
- MIRON, J.; BEN-GHEDALIA, D.; MORRISON, M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1294-1309, June 2001.

MOHAMED, D. E. A. et al. Effect of dietary supplementation with fibrolytic enzymes on the productive performance of early lactating dairy cows. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 6, p. 146-155, 2013.

MORAIS, S.; MIZRAHI, I. Islands in the stream: from individual to communal fiber degradation in the rumen ecosystem. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 43, p. 362-379, Apr. 2019.

MORGAVI, D. P. et al. A *Trichoderma* feed enzyme preparation enhances adhesion of *Fibrobacter succinogenes* to complex substrates but not to pure cellulose. In: CONFERENCE ON RUMEN FUNCTION, 25., 2000, Chicago. **Proceedings...** Chicago: [s.n.], 2000e. p. 26-31.

MUIRHEAD, S. (Ed.) **Direct-fed microbial, enzyme, and forage additive compendium**. 3. ed. Minnetonka: The Miller Publishing Company, 1996. 391 p.

NELSON, D. L.; MICHAEL M.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 4. ed. In: São Paulo: Sarvier, 2007. 1298 p.

NOROUZIAN, D. Effect of different factors on fermentative production of enzymes by fungi. **Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology, Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology**, Takamatsu, v. 2, p. 14-18, 2008.

NSEREKO, V. L. et al. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 48, n. 1, p. 14-20, Jan. 2002.

O'KIELY, P. Aerobic stability and deterioration of grass silages after mixing with concentrates at feedout. In: AGRICULTURAL RESEARCH FORUM, 2007, Tullamore. **Proceedings...** Tullamore: [s.n.], 2007. p. 99.

OLSEN, S. N. et al. Kinetics of enzymatic high-solid hydrolysis of lignocellulosic biomass studied by calorimetry. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 163, n. 5, p. 626-635, Mar. 2011.

PAHLOW, G. et al. Microbiology of Ensiling. In: SILAGE SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2003, Buxton. **Proceedings...** Buxton: [s.n.], 2003. p. 31-93.

PALOHEIMO, M.; PIRONEN, J.; VEHEMAANPERA, J. Xylanases and cellulases as feed additives. In: BEDFORD, M. R.; PARTRIDGE, G. G. (Ed.). **Enzymes in farm animal nutrition**. 2. ed. London: CABI, 2011. p. 12-53.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdã, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, Mar. 2003.

PAYNE, C. M. et al. Fungal cellulases. **Chemical Review**, Easton, v. 115, n. 3, p. 1308-1448, Feb. 2015.

- PETERS, A. et al. Effect of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal fermentation and nutrient digestion in dairy cows. **Archives Animal Nutrition**, Abingdon, v. 64, n. 3, p. 221-237, June 2010.
- POUTANEN, K. Na α -L-arabinofuranosidase of trichoderma reesei. **Journal Biotechnology**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 271-281, 1988.
- PRASANNA, H. N.; RAMANJANEYULU, G.; RAJASEKHAR, R. B. Optimization of cellulose production by *Penicillium* sp. **Three Biotech**, Berlin, v. 6, n. 2, p. 162, Dec. 2016.
- QUINLAN, R. J. et al. Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 37, p. 15079-15084, Sept. 2011.
- RODE, L. M.; YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A. Fibrolytic enzyme supplements for dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 10, p. 2121-2126, Oct. 1999.
- ROMERO, J. J. et al. Effect of adding cofactors to exogenous fibrolytic enzymes on preingestive hydrolysis, in vitro digestibility, and fermentation of bermudagrass haylage. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 98, n. 7, p. 1-14, Apr. 2015.
- ROMERO, J. J. **Improving the potency and reliability of exogenous fibrolytic enzymes for enhancing forage utilization by dairy cows**. 2013. 198 p. PhD (Doctor of Philosophy) - University of Florida, Gainesville, 2013.
- RUSSEL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 73, n. 5, p. 363-370, Nov. 1992.
- RYCHEN, G. et al. Safety and efficacy of RONOZYMER WX (endo-1,4- β -xylanase) as a feed additive for laying hens. **European Food Safety Authority**, Hoboken, v. 15, p. e05020, 2017.
- SAINI, A.; AGGARWAL, N. K.; YADAV, A. Cost-effective cellulase production using *Parthenium hysterophorus* biomass as an unconventional lignocellulosic substrate. **Three Biotech**, Berlin, v. 7, n. 1, p. 12, May 2017.
- SCHINGOETHE, D. J.; STEGEMAN, G. A.; TREACHER, R. J. Response of lactating dairy cows to a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 5, p. 996-1003, May 1999.
- SCHWARZ, W. H. The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 56, n. 5-6, p. 364-649, Sept. 2001.
- SEPPÄLÄÄ, A. et al. Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations A. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 179, n. 1/4, p. 54- 60, Dec. 2013.
- SHALLOM, D.; SGOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 6, n. 3, p. 219-228, June 2003.

- SHEPERD, A. C.; KUNG JUNIOR, L. An enzyme additive for corn silage: effects on silage composition and animal performance. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 10, p. 1760-1766, Oct. 1996.
- SHUANGQI, T. et al. Determination methods of cellulose activity. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 37, p. 7122-7125, July 2011.
- SILVA, T. H. et al. Effects of dietary fibrolytic enzymes on chewing time, ruminal fermentation, and performance of mid-lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, v. 221, Part A, p. 35-43, Nov. 2016.
- SIQUEIRA, G. R.; BERNARDES, T. F.; REIS, R. A. Instabilidade aeróbia de silagens: efeitos e possibilidades de prevenção. In: REIS, R. A.; SIQUEIRA, G. R.; BERTIPAGLIA, L. M. A. (Ed.). **Volumosos na produção de ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2005. p. 25-60.
- SOCCOL, C. R. et al. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 41, p. 330-336, May 1994.
- SOLOMON, J. et al. Isolation and characterization of mutants of the *Bacillus subtilis* oligopeptide permease with altered specificity of oligopeptide transport. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 21, p. 6425-6433, Nov. 2003.
- SPOELSTRA, S. F.; COURTIN, M. G.; VAN BEERS, J. A. C. Acetic acid bacteria can initiate aerobic deterioration of maize silage. **Journal of Agriculture Science**, London, v. 111, p. 127-132, 1988.
- SUTTON, J. D. et al. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme on digestive processes and milk production in Holstein-Friesian cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 546-556, Feb. 2003.
- TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 107, n. 5, p. 632-1641, Nov. 2009.
- TIRADO-GONZALEZ, D. N. et al. Meta-analysis: effect of exogenous fibrolytic enzymes in ruminant diets. **Journal of Applied Animal Research**, Janakpuri, v. 46, p. 771-783, Nov. 2017.
- TOMME, P.; WARREN, R.; GILKES, N. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbial Physiology**, London, v. 37, p. 1-81, 1995.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 476 p. 1994.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n.10, p. 3583-3597, 1991.

VICINI, J. L. et al. Effect of feeding supplemental fibrolytic enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 2, p. 576-585, Feb. 2003.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentals of biochemistry**. 4. ed. New York: John Wiley & Sons, 2010. 1204 p.

WALLACE, R. J. et al. Influence of supplementary fibrolytic enzymes on the fermentation of corn and grass silages by mixed microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 7, p. 1905-1916, July 2001.

WANG, Y. et al. Effects of an exogenous enzyme preparation on microbial protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation Technique (Rusitec). **British Journal Nutrition**, v. 85, n. 3, p. 325-332, Mar. 2001.

WEIMER, P. J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 3114-3122, Dec. 1998.

WHITE, B. A.; MACKIE, R. I.; DOERNER, K. C. Enzymatic hydrolysis of forage cell walls. In: JUNG, H. G. et al. (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: ASA, 1993. p. 455-498.

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

WOOLFORD, M. K. Microbiological screening of food preservatives, cold sterilants and specific antimicrobial agents as potential silage additives. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 26, n. 2, p. 229- 237, Feb. 1975.

YANG, W. Z., BEAUCHEMIN, K. A; RODE, L. M. Effects of grain processing, forage to concentrate ratio, and forage particle size on rumen pH and digestion by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 10, p. 2203-2216, Oct. 2001.

YANG, W. Z.; BEAUCHEMIN, K. A.; VEDRES, D. D. Effects of pH and fibrolytic enzymes on digestibility, bacterial protein synthesis, and fermentation in continuous culture. **Animal Feed Science and Technology**, Leicestershire, v. 102, n. 1, p. 137-150, Dec. 2002.

YANG, Y. et al. Production performance, nutrient digestibility, and milk fatty acid profile of lactating dairy cows fed corn silage- or sorghum silage based diets with and without xylanase supplementation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 102, n. 3, p. 2266-2274, Mar. 2019.

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

ZHANG, J.; TANG, M.; VIKARI, L. Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases. **Bioresource Technology**, Barking, v. 121, p. 8-12, Oct. 2012.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, Hoboken, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.

ZHANG, Y.; TANG, B.; DU, G. Self-induction system for cellulase production by celobiose produced from glucose in *Rhizopus stolonifer*. **Scientific Report**, Cairo, v. 7, n. 10161, 2017.

ZHENG, W. D. et al. Determination of when during the lactation cycle to start feeding a cellulose and xylanase enzyme mixture to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 10, p. 2319-2325, Oct. 2000.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

**ARTIGO 1 - DIET DIGESTIBILITY AND LACTATION PERFORMANCE OF
DAIRY COWS FED FIBROLYTIC ENZYMES**

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO FORMATADO DE ACORDO COM AS NORMAS PARA SUBMISSÃO DO
*JOURNAL OF DAIRY SCIENCE***

1 Josiane P. Santos^a, Wesley R. Silva^a, Lucas C. Resende^a, Josué T. Ramos^a, Eugênio F. Barbosa^a,
2 Julia D. L. Dias^a, Rayana B. Silva^b, Renata A. N. Pereira^c, Marcos N. Pereira^a

3

4 ^a Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Lavras, MG, 37200-900, Brazil

5 ^b Better Nature Research Center, Ijaci, MG, 37.218-000, Brazil.

6 ^c Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Sul de Minas,
7 Lavras, MG, 37200-900, Brazil

8

9

ABSTRACT

10 This experiment evaluated the effect of a *Trichoderma reesei* derived liquid fungal extract
11 preparation with cellulase and xylanase activities on lactation performance, feed efficiency, diet
12 digestibility, ruminal fermentation, and chewing behavior of dairy cows fed a corn silage based
13 diet. Twenty-eight Holstein cows (221 ± 83 days in lactation) were individually fed a
14 standardization diet for 14 days and a treatment diet for 56 days, in a covariate adjusted
15 randomized block design with repeated measures over time. Treatments were control (CTL) or
16 enzyme (ENZ. 0.75 mL/kg of diet dry matter). Diets contained 48.3% corn silage, 3.9% oat
17 hay, 8.6% whole cottonseeds, 20.6% ground corn, 15.8% soybean meal, 36.5% neutral
18 detergent fiber, and 29.5% starch on a dry matter (DM) basis. Milk yield and DM intake (DMI)
19 were recorded daily, the total tract apparent digestibility of nutrients and ruminal fermentation
20 profile were evaluated on week 8, and rumination and eating behaviors on weeks 4 and 8.
21 Significance was declared at $P \leq 0.05$ and trends at $P \leq 0.10$. The total tract digestibility
22 coefficients of neutral detergent fiber (46.1%) and starch (93.6%), the proportion of consumed
23 intact corn kernels excreted in feces, fecal viscosity, and fecal composition did not differ. The
24 DMI (21.0 kg/d), milk yield (26.3 kg/d), and the milk to DMI ratio (1.34) also did not differ.
25 The ENZ tended to increase milk fat concentration, increased the concentration of milk protein

26 on weeks 6 and 8, and increased milk solids concentration. The molar proportion of propionate
27 in total volatile fatty acids tended to be reduced (19.7% vs. 18.5%) on ENZ, inducing a trend
28 for increased acetate to propionate ratio (3.59 vs. 3.29). The ENZ increased milk urea-N on
29 week 3 and tended to increase plasma urea-N over time, suggesting protease activity.
30 Treatments had no effect on rumination and eating behaviors. The supplementation of lactating
31 cows with ENZ had no effect on fiber digestibility and feed efficiency, tended to increase the
32 acetate to propionate ratio in reticular fluid, and increased milk solids concentration.

33 **Keywords:** feed efficiency, fiber digestibility, fungal extract, milk solids, sorting behavior

34 INTRODUCTION

35 Exogenous fibrolytic enzymes (**EFE**), mainly with cellulase and xylanase activities, have
36 been added to diets of dairy cows with the aim of improving fiber digestibility. It has been
37 suggested that EFE may improve fiber digestion by action on silage (Muck et al., 2018) or hay
38 (Feng et al. 1996), on fibrous feedstuffs when added to the diet at mixing, and on ruminal
39 fermentation and intestinal digestion of fiber after ingestion (Beauchemin et al., 2003; Meale et
40 al. 2014). The supplementation of EFE may enhance the number of fiber-digesting
41 microorganisms in the rumen (Nsereko et al., 2002; Chung et al., 2012). In a meta-analysis of
42 continuous experimental designs (Arriola et al., 2017), the mean milk yield response to EFE
43 added to the diet was positive and there was a trend for increased total tract fiber digestibility;
44 the response was small, variable, and was not associated to increased feed intake. The
45 mechanism by which supplemented enzymes act has not yet been fully elucidated and may be
46 dependent on factors such as the composition of the basal diet (Arriola et al., 2011), stage of
47 lactation (Schingoethe et al., 1999), form of supplementation (Sutton et al, 2003), and type and
48 dosage of product (Eun and Beauchemin, 2007), among other factors (Adesogan et al., 2014).

49 Fibrolytic enzyme additives available in the market are not directly comparable, since
50 they may contain differing types of carbohydrases, including cellulases and hemicellulases

51 (Beauchemin et al., 2003; Meale et al. 2013, Adesogan et al., 2014). VistaPre-T (AB Vista,
52 Marlborough, UK) has been evaluated as a potential EFE source for dairy cows. The product
53 has cellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities. Dosages evaluated *in vivo*
54 ranged from 0.5 to 1.0 mL/kg of diet dry matter (**DM**). When fed to 60 early-lactation Holstein
55 cows for 10 weeks, the product had no effect on milk yield and reduced DM intake (**DMI**),
56 increasing the milk to DMI ratio (Holtshausen et al., 2011). This enzyme has potential to
57 increase fiber digestibility and to increase feed efficiency of dairy cows.

58 Hence, this study was conducted to evaluate the effect of EFE added to a corn silage based
59 total mixed ration (**TMR**) on lactation performance, DMI, feed efficiency, diet digestibility,
60 ruminal fermentation, and chewing behavior of dairy cows. We hypothesized that enzyme
61 supplementation would improve fiber digestibility and feed efficiency.

62 **MATERIALS AND METHODS**

63 The protocol was approved by the University of Lavras Bioethics Committee in
64 Utilization of Animals (Protocol 031-17).

65 ***Housing, Cows, Diets, and Experimental Design***

66 The experiment was conducted from January 9th to March 19th, 2017 in an open-walled,
67 sand-bedded tie-stall barn with fans and high pressure sprinklers. The research center is located
68 at 846 m above sea level, 21° 09' 52.41" latitude south, and 44° 55' 52.40" longitude west.
69 Environmental temperature and relative humidity at the center of the barn were measured at 30
70 min intervals with a digital thermometer (EasyLog-USB-2-LCD. Lascar Electronics, Salisbury,
71 UK) located 2.5 m from the floor. The temperature-humidity index (**THI**) was calculated
72 according to Yousef (1985): $THI = T + 0.36 \times DP + 41.2$; where T = temperature (°C) and DP
73 = dew point (°C). Temperature was 23.3 ± 4.2 °C and humidity was 79.2 ± 14.2 % (Mean \pm SD.
74 2688 recordings). The THI was 71.4 ± 4.7 . THI > 68 was observed 76% of time.

75 Twenty-eight Holstein cows (201 ± 83 days in lactation at the beginning of the
76 experiment, 9 primiparous) were individually fed the same TMR for a 14-d standardization
77 period. On d 10 to 14 of this period, DMI, milk yield, milk solids, feed efficiency, somatic cell
78 count (**SCC**), milk urea-N (**MUN**), body weight (**BW**), and body condition score (**BCS**) were
79 measured and used as covariate in the statistical model. Cows were paired blocked primarily
80 by parity (1 vs. ≥ 2) and secondarily by milk yield. Within a block, each cow received a
81 treatment for 56 d, in a covariate-adjusted randomized block design with repeated measures
82 over time. Treatments were: Control (CTL. No feed additive) or Enzyme (ENZ. 0.75 mL/kg of
83 diet DM. VistaPre-T, AB Vista, Marlborough, UK). Mean \pm SD at blocking were: Milk yield
84 30.4 ± 5.8 and days in lactation 199 ± 80 on CTL and 30.4 ± 6.0 kg/d and 204 ± 86 d on ENZ,
85 respectively. Seven samples of the *Trichoderma reesei* fermentation product obtained
86 throughout the experiment were analyzed with an internal manufacturer's wet chemistry assay
87 (Enzyme Services and Consultancy, Innovation and Technology Centre, Ystrad Mynach, UK).
88 Enzyme activities were $444,000 \pm 23,459$ BXU/g for xylanase (Standard Analytical Method
89 036) and $15,314 \pm 623$ ECU/g for cellulase (Standard Analytical Method 044), where 1 BXU
90 is the amount of enzyme that will release $0.06 \mu\text{mol}$ of reducing sugars (xylose equivalents)
91 from birch xylan per minute at pH 5.3 and 50°C and 1 ECU is the amount of enzyme that will
92 release $0.06 \mu\text{mol}$ of reducing sugars as glucose from hydroxyethyl cellulose per minute at pH
93 4.8 and 50°C .

94 The enzyme product was diluted in distilled water (1:15) and added to the TMR during
95 mixing 2 x/d in a 1.2 m^3 vertical stationary mixer. The same volume of water was added to the
96 CTL TMR. New feed was offered at 0700 h and 1300 h and was pushed up at least 10 x/d. The
97 compositions of the consumed diet in nutrients and of the offered TMR in ingredients are in
98 Table 1. Individual cow intake was assessed throughout the experiment by recording the amount
99 of feed offered and orts daily. The TMR was offered to allow for 10% refusals. The DM

100 concentration of forages was determined weekly with a microwave oven and diets were
101 adjusted as necessary. Samples of each ingredient were collected daily and composite samples
102 were made per week. Likewise, samples of orts were collected daily and composited per cow
103 per week. Composite samples were dried in a forced-air oven at 55°C for 72 h and ground
104 through a 1-mm Wiley mill screen (Thomas Scientific, Swedesboro, USA). The DM
105 concentration was determined by drying at 100°C for 24 h. The composition of the consumed
106 diet in nutrients was calculated by summation of the intake of nutrients per cow (composition
107 of offered ingredients minus orts on a DM basis) divided by the total DMI for the treatment.
108 The crude protein (**CP**) was determined by micro-Kjeldahl analysis according to method 990.03
109 and ether extract (**EE**) was analyzed according to method 920.39 of AOAC International
110 (2012). Ash was analyzed by incineration at 550°C for 8 h. The ash-free neutral detergent fiber
111 (**NDF**) was determined by filtration in porous crucibles with heat stable amylase and sodium
112 sulfide (Van Soest et al., 1991). Starch plus free glucose was analyzed enzymatically according
113 to Hall (2009). The non-fiber carbohydrate fraction was calculated as: $100 - (\text{CP} + \text{EE} + \text{Ash} +$
114 $\text{NDF})$. The particle size distribution of the TMR, oat hay, and corn silage were measured on
115 composites of daily samples with the Penn State Particle Separator using the 8 mm and 19 mm
116 diameters screens and pan (Lammers et al., 1996).

117 *Variables and Data Collection*

118 Cows were milked 3 ×/d starting at 0500, 1300, and 2000 h in an adjacent herringbone
119 parlor and milk yield was recorded daily. Milk samples equivalent to 0.5% of the production of
120 each milking were obtained on d 10 to 14 of the standardization period and on d 6 and 7 of each
121 week during the comparison period. Composite milk samples were stored under refrigeration
122 in flasks containing 2-bromo-2-nitropropane-1-3-diol preservative until analysis for at most 2
123 d until shipping to a commercial laboratory. Milk components, SCC, and MUN concentrations
124 were measured by mid-infrared analysis (Bentley Instruments Inc., Chaska, USA) at the

125 Laboratory of the Paraná State Holstein Breeders Association (APCBRH, Curitiba, Brazil).
126 Yields (kg/d) of fat, protein, lactose, and total solids were calculated per cow per week. Milk
127 energy secretion (Mcal/d) was calculated as (NRC, 2001): $[(0.0929 \times \% \text{ fat}) + (0.0547 \times \% \text{ protein}) + (0.0395 \times \% \text{ lactose})] \times \text{kg of milk}$. Energy corrected milk (**ECM**, kg/d) was: Milk
128 energy secretion/0.70 (assumes 0.70 Mcal/kg of milk with 3.7% fat, 3.2% protein, and 4.6%
129 lactose). The BW and BCS were measured at 14-d intervals. The BW was measured after the
130 morning milking during two consecutive days. Daily BW change was calculated as the slope
131 of the linear regression of BW over time. The BCS (scale of 1 to 5, Wildman et al., 1982) was
132 the mean of 3 independent evaluators.
133

134 The total tract apparent digestibility of DM, organic matter (**OM**), NDF, non-NDF OM,
135 and starch were determined by collection of feces on d 54 to 56. Feces were collected in buckets
136 by 1 person for every 2 cows concurrent to defecation during 3 continuous 8-h sampling periods
137 and weighed. The second and third sampling periods were each delayed by 8 h, thus
138 representing a 24-h collection. Fecal aliquots (equal fresh weight basis) were immediately
139 frozen along the collection period and composite samples were formed per cow. Composite
140 fecal samples were dehydrated for 72 h at 55°C in a forced air oven. Concentrations of DM,
141 NDF, ash, and starch were determined as previously described.. The digestible OM intake
142 (**DOMI**) was calculated. Measures of feed efficiency were calculated: Milk/DMI, ECM/DMI,
143 and ECM/DOMI.

144 Viscosity of fecal samples used for the determination of diet digestibility were evaluated
145 according to an adaptation of the methodology of Cannon et al. (2010). Samples of 100 g of
146 fresh feces were diluted in 120 mL of water. The solution was homogenized with a metal spatula
147 for 30 s and filtered through two layers of cheesecloth. The viscosity of the solution was
148 measured with a rotational viscometer (Model DV-E, Brookfield Engineering Laboratories,
149 Middleboro, USA) at 100 rpm with spindle LV-1 and temperature of 24°C.

150 Intact corn kernels were measured on samples of corn silage and in feces from each cow
151 on d 56. Feces were washed with tap water to separate material retained on a 4 mm diameter
152 sieve. Retained corn kernels were manually counted and expressed per mass of fresh feces. The
153 proportion of the consumed intact kernels lost in feces was calculated.

154 Urine was collected in buckets (1 person/2 cows) concurrent to urination simultaneously
155 to fecal sampling (d 54 to 56) to estimate the relative ruminal microbial yield based on purine
156 derivative excretion (mmol/d). A 20% sulfuric acid solution (200 mL) was added to 20 L
157 buckets and urine was added to it during the collection period. At the end of the collection
158 period, composite urine samples were diluted 1:5 with a 4% sulfuric acid solution and frozen
159 at -20°C. Allantoin was analyzed according to Chen and Gomes (1992).

160 During days 26 to 28 and 51 to 53 the proportions of daily intake in the morning (0700 to
161 1300 h), afternoon (1300 to 1900 h), and night (1900 to 0700 h) were determined by measuring
162 feed availability per cow at 0700, 1300, and 1900 h and orts at 1300, 1900 and 0700 h. Chewing
163 activity and particle size sorting behavior were measured on d 27 and 53. Feed particles sorting
164 behavior was evaluated as the proportion of particles above the 19 mm mesh diameter screen
165 and above and below the 8 mm mesh screen of the Penn State Particle Separator at 0600 h and
166 1300 h for the offered TMR and at 1200 h, 1900 h, and 0600 h for refusals. Feed refusals at
167 1300 h were mixed with feed offered at 1300 h for measurement of the TMR particle size of
168 each cow. The predicted intake (as-fed basis) of particles on each screen was: % TMR retained
169 on screen \times kg of TMR consumed. The observed intake of particles was: % TMR retained on
170 screen \times kg of TMR offered - % orts retained on screen \times kg of orts. The selection index was
171 $100 \times (\text{observed intake}/\text{predicted intake})$. For the calculation of starch and NDF sorting
172 behavior the predicted intake of a nutrient was: % of nutrient in offered TMR DM \times kg of DMI.
173 The observed intake was: % of nutrient in offered TMR DM \times kg of offered TMR DM - % of
174 nutrient in orts DM \times kg of orts DM. The selection index was: $100 \times (\text{observed intake}/\text{predicted}$

175 intake). Sorting values below 100% represent selective refusal, above 100% represent
176 preferential intake, and equal to 100% represent no selection.

177 Eating and rumination behaviors were evaluated on d 27 and 53 by visual observation of
178 the buccal activities of each cow at 5-min intervals continuously for 24 h. Buccal activities
179 evaluated were: eating, rumination, water ingestion, and idleness. Eating and rumination per
180 unit of DMI were calculated using the intake of the day in which chewing activity was
181 evaluated. A meal was defined by at least 2 consecutive 5-min eating events following at least
182 10 min of idleness or rumination. To generate the meal pattern data, the minimum 10-min
183 intermeal interval was adopted based on the reasoning of Mullins et al. (2012) for a 12-min
184 interval. Meal duration was the ratio between eating time (min/d) and meals/d. Rumination
185 duration was the ratio between rumination time (min/d) and ruminations/d. The intervals
186 between meal and rumination events were: $(1440 \text{ min} - \text{event in min/d})/(\text{events/d} - 1)$. The
187 duration of the first daily meal (conditioned meal) was measured with a chronometer. Five
188 evaluators observed the behavior of all cows after offering feed at 0700 h until the last cow
189 finished its first meal.

190 Blood samples from the coccygeal vessels were obtained on d 54 in vacutainer tubes
191 containing EDTA to determine plasma urea-N (**PUN**) concentration. Samples for PUN were
192 obtained at 0, 1.5, 3, 6, 9, and 12 h after the morning feeding. Plasma was obtained by
193 centrifugation at $1,800 \times g$ for 10 min and was stored at -20°C until analysis (Urea 500. Doles
194 Reagentes para Laboratórios Ltda, Goiânia, Brazil).

195 Reticular fluid samples were collect on d 56 with a flexible oro-gastric tube connected to
196 a vacuum pump. Samples were obtained 12.0 ± 0.9 h after the morning feeding at random within
197 block. A fluid sample was frozen in liquid nitrogen to suppress fermentation and stored at -
198 20°C until preparation for analysis of volatile fatty acids by gas chromatography with a HP-
199 FFAP capillary column (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) according to Ferreira et al.

200 (2016). Another sample was mixed to a 36% formaldehyde solution for protozoa counting. The
201 sample was stained according to Dehority (1984) and total protozoa was enumerated with an
202 optical microscope in a Neubauer chamber (Warner, 1962).

203 *Statistical Analysis*

204 Data obtained over time were analyzed with the PROC MIXED of SAS (version 9.3,
205 2011; SAS Institute Inc., Cary, USA) using a repeated measures approach. The statistical model
206 contained the covariate effect (measurement of the same variable at the end of the
207 standardization period), the random effect of block (1 to 14), the fixed effects of treatment
208 (CTL, ENZ) and time (day, week, or hours), and the interaction between treatment and time.
209 Cow nested within treatment was defined as the whole plot error. For each variable, the best
210 covariance structure was defined by the Schwarz's Bayesian criteria among first-order
211 autoregressive, compound symmetry, and unstructured. Degrees of freedom were calculated
212 using the Kenward-Roger option. Similar models were used for variables measured once during
213 the experiment and for variables without the covariate adjustment by removing the covariate,
214 time, and its interaction with treatment from the previous model. Significance was declared at
215 $P \leq 0.05$ and trends at $P \leq 0.10$.

216 **RESULTS AND DISCUSSION**

217 The sources of physically effective NDF in the diet were corn silage, oat hay, and whole
218 cottonseeds; corn silage NDF represented 68.3% of total dietary NDF (Table 1). During the
219 experiment, weekly composites of daily samples of corn silage were analyzed by near-infrared
220 spectroscopy in a commercial laboratory (3rLab, Lavras, Brazil) and the *in vitro* total tract NDF
221 digestibility (TTNDFD) was estimated according to Lopes et al. (2015). Fiber digestion
222 parameters of the 8 experimental composite samples of corn silage were (mean \pm SD):
223 TTNDFD = $40.7 \pm 2.3\%$ of NDF; NDF degradation in 24 h = $24.8 \pm 1.8\%$ of NDF; NDF
224 degradation in 30 h = $30.0 \pm 1.8\%$ of NDF; NDF degradation in 48 h = $47.4 \pm 2.7\%$ of NDF;

225 NDF degradation in 240 h = $67.5 \pm 3.9\%$ of NDF; and the fractional degradation rate of NDF
226 fraction B (kd) = $4.7 \pm 0.3\%/h$. The corn silage used in the experiment was not of high TTNDFD
227 ($> 42\%$), suggesting that EFE could improve the total tract NDF digestibility of the diet and
228 potentially improve animal performance.

229 However, there was no evidence that the dosage of product used in this experiment (15.5
230 mL/cow/d) induced change in total tract NDF digestibility. Treatment ENZ induced only a
231 numerical non-statistical increase in the NDF digestibility coefficient (+ 3.1%-units) (Table 2).
232 In their meta-analysis, Arriola et al. (2017) observed a trend ($P = 0.10$) for an increase in NDF
233 digestibility of + 2.3%-units in response to EFE. The variability among cows in the NDF
234 digestibility coefficient possibly precluded the detection of a significant treatment effect in our
235 experiment. Measures of fecal composition and viscosity and the recovery of intact corn kernels
236 in feces (Table 2) also suggest that diet digestibility was not affected by ENZ.

237 The similarity in NDF digestibility between treatments may have been the result of a
238 ruminal pH not low enough for EFE to have ideal action (Vicini et al., 2003; Beauchemin et al.,
239 2004). Exogenous fungal enzymes differ from rumen enzymes by having a lower optimum pH
240 (Morgavi et al., 2000; Adesogan et al., 2014), desirable when ruminal pH is suboptimal for
241 efficient fiber digestion (Russel and Wilson, 1996). Reticular pH measured by stomach tubing
242 12 h post-morning feeding was 6.37 on CTL and 6.31 on ENZ ($P = 0.87$), not suggestive of
243 ruminal acidosis (Aschenbach et al., 2011), despite the high starch concentration in the diet
244 (29.5% of diet DM). The effect of EFE was more pronounced in cows in early than in late
245 lactation (Schingoethe et al., 1999; Knowlton et al., 2002; El Bordney et al., 2015) and on diets
246 with reduced forage concentration (Arriola et al., 2011), suggesting that propensity for low
247 ruminal pH may be a favorable factor for EFE activity in the rumen. The supplementation of
248 dairy cows with fibrolytic enzymes increased total tract NDF digestibility and ruminal
249 microbial yield only when short particles corn silage that induced lowered ruminal pH was fed

250 in substitution to long particles corn silage (Dias Junior, 2016). Morgavi et al. (2000) also
251 observed that EFE supplementation alleviated the drop in NDF digestibility caused by low pH,
252 but did not affect NDF digestibility when pH was close to the optimum for fiber digestion. The
253 effect of EFE on high-grain diets fed to beef cattle have been more consistent than those on
254 high-forage diets (Beauchemin et al., 2003). It seems that the utilization of EFE in dairy herds
255 should be directed by the occurrence of nutrition management scenarios capable of limiting
256 hydrolase activity in the rumen (e.g. low ruminal pH) and EFE should not be randomly added
257 to dairy diets.

258 Treatment ENZ had no effect on DMI, milk yield, feed efficiency, and body tissue
259 deposition (Table 3). Nevertheless, treatment ENZ tended to increase milk fat concentration
260 and increased milk solids concentration (Table 3). An interaction between week and treatment
261 was detected for the concentration of protein in milk (Table 3). Treatment ENZ increased milk
262 protein concentration in experimental weeks 6 and 8, but had no effect during the other
263 experimental weeks (Figure 1). We cannot propose a reason for this variation in protein
264 concentration over the duration of the experiment. Both the increase in protein and fat
265 concentrations contributed to the increase in total solids concentration on ENZ, although there
266 was no detectable change in the yields of fat, protein, lactose, or total milk components.

267 Various surveys of the literature have examined the effect of EFE on dairy cow
268 performance, intake, and digestibility. Beauchemin et al. (2003) reported average positive
269 responses in DMI of 1.0 ± 1.3 kg/d and in milk yield of 1.1 ± 1.5 kg/d. Meale et al. (2013)
270 concluded that few studies have reported positive effects on milk yield and production of milk
271 components. Adesogan et al. (2014) reported increases in milk yield and DMI and reduction in
272 milk yield/DMI, concluding that the absence of a milk yield response to EFE supplementation
273 is a common occurrence in the literature. Tirado-González et al. (2017) concluded that EFE
274 negatively affected DMI, improved milk yield and solids content in low-forage diets (< 50% of

275 DM), and had positive effects on the yields of milk, fat and protein in high-forage diets. The
276 meta-analysis of Arriola et al. (2017) detected a small reduction in milk fat concentration (-
277 0.05 %-units) and increases in the yields of fat (+ 0.02 kg/d) and protein (+ 0.03 kg/d) in
278 response to EFE. The effect of EFE on milk and solids secretion seems to be small and variable.

279 The trend for the increase in milk fat concentration (Table 3) is in agreement with the
280 trend for increased acetate to propionate ratio in reticular fluid on treatment ENZ (Table 4).
281 Treatment ENZ induced a minor change in ruminal fermentation profile, although ruminal
282 microbial yield and protozoa concentration did not differ (Table 4). The increase in the acetate
283 to propionate ratio is consistent with the increase in methanogenic bacteria when EFE was fed
284 to dairy cows (Zhou et al., 2011; Chung et al., 2012). However, the change induced by ENZ on
285 ruminal fermentation profile was not associated to detectable changes on chewing behavior
286 (Table 5), suggesting that the effect on ruminal fermentation was of low magnitude.

287 The concentration of MUN was increased by ENZ on week 3 (Figure 2), inducing the
288 trend for the interaction between week and treatment for this variable (Table 3). The
289 concentration of PUN over time followed the same upward trend in response to ENZ (Figure
290 3). The trends for increase in urea-N in milk and plasma suggest that the enzymatic preparation
291 of *Trichoderma reesei* had some proteolytic activity in the rumen. Commercial products
292 containing EFE are semipurified compounds and may contain secondary enzymatic activities.
293 Proteolytic action could be advantageous to degrade corn prolamins and increase starch
294 digestibility of flint corn based diets (Ferraretto et al., 2015), as the diet in this experiment.
295 However, there was no indication that increased proteolytic activity increased total tract starch
296 digestibility (Table 2).

CONCLUSIONS

297

298

299

300

The supplementation of dairy cows with EFE had no effect on fiber digestibility and feed efficiency. Enzymes induced a trend for increased acetate to propionate ratio in reticular fluid and increased milk solids concentration.

301

REFERENCES

302

303

304

Adesogan, A.T., Ma, Z.X., Romero, J.J., Arriola, K.G., 2014. Improving cell wall digestion and animal performance with fibrolytic enzymes. *J. Anim. Sci.* 92, 1317-1330. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7273>.

305

306

AOAC International, 2012. *Official Methods of Analysis*, nineteen ed. Association of Official Agricultural Chemists, Rockville.

307

308

309

Arriola, K.G., Kim, S.C., Staples, C.R., Adesogan, A.T., 2011. Effect of fibrolytic EFE application to low- and high-concentrate diets on the performance of lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 94, 832-841. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3424>.

310

311

312

313

Arriola, K.G., Oliveira, A.S., Ma, X.Z., Lean, I.J., Giurcanu, M.C., Adesogan, A.T., 2017. A meta-analysis on the effect of dietary application of exogenous fibrolytic enzymes on the performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 100, 1-15. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12103>.

314

315

316

Aschenbach, J.R., Penner, G.B., Stumpff, F., Gabel, G., 2011. Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J. Anim. Sci.* 89, 1092-1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>.

317

318

319

Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, D.P., Yang, W.Z., 2003. Use of exogenous fibrolytic enzymes to improve feed utilization by ruminants. *J. Dairy Sci.* 81, 37-47. https://doi.org/10.2527/2003.8114_suppl_2E37x.

- 320 Beauchemin, K.A., Colombatto, D., Morgavi, P., Yang, W.Z., Rode, L.M., 2004. Mode of
321 action of exogenous cell wall degrading enzymes for ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 13-
322 22. <https://doi.org/10.4141/A02-102>.
- 323 Cannon, S.J., Fahey Jr., G.C., Murphy, M.R., Dikeman, C.L., Miller, B.L, Drackley, J.K., 2010.
324 Inclusion of psyllium in milk replacer for neonatal calves. 1. Effects on growth, digesta
325 viscosity, rate of passage, nutrient digestibilities, and metabolites in blood. *J. Dairy Sci.*
326 93, 3652-3660. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2731>.
- 327 Chen, X.B., Gomes, M.J., 1992. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle
328 based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details, in:
329 International Feed Research Unit. Rowett Research Institute, Aberdeen.
- 330 Chung, Y.H., Zhou, M., Hotshausen, L., Alexander, T.W., Mcallister, T.A., Guan, L.L. Oba,
331 M., Beauchemin, K.A., 2012. A fibrolytic enzyme additive for lactating Holstein cow diets:
332 ruminal fermentation, rumen microbial populations, and enteric emissions. *J. Dairy Sci.*
333 95, 1419-1427. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4552>.
- 334 Dehority, B.A., 1984. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting
335 rumen protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 182-185.
336 <https://doi.org/10.1128/aem.48.1.182-185.1984>.
- 337 Dias Jr., G.S. Processing of corn silage and supplementation of dairy cows with fibrolytic
338 enzymes. 2016. 179 p. [Thesis. Doctorate in Veterinary Sciences]. University of Lavras,
339 Lavras. Lavras, 2016.
- 340 El-Bordeny, N.E., Abedo, A.A., El-Sayed, H.M., Daoud, E.N., Soliman, H.S., Mahmoud,
341 A.E.M., 2015. Effect of exogenous fibrolytic enzyme application on productive response
342 of dairy cows at different lactation stages. *Asian. J. Anim. Vet. Adv.* 10, 226-236.
343 <http://dx.doi.org/10.3923/ajava.2015.226.236>.

- 344 Eun, J.S., Beauchemin, K.A., 2007. Enhancing in vitro degradation of alfalfa hay and corn
345 silage using feed enzymes. *J. Dairy Sci.* 90, 2839-2851. [https://doi.org/10.3168/jds.2006-](https://doi.org/10.3168/jds.2006-820)
346 820.
- 347 Feng, P., Hunt, C.W., Pritchard, G.T., Julien, W.E., 1996. Effect of enzyme preparations on in
348 situ and in vitro degradation and in vivo digestive characteristics of mature cool-season
349 grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 74, 1349-1357.
350 <https://doi.org/10.2527/1996.7461349x>.
- 351 Ferraretto, L.F., Fredin, S.M., Shaver, R.D., 2015. Influence of ensiling, exogenous protease
352 addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal
353 in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 98, 7318-
354 7327. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9891>.
- 355 Ferreira, E.M., Pires, A.V., Susin, I., Biehl, M.V., Gentil, R.S., Parente, M.O.M, Polizel, D.M.,
356 Ribeiro, C.V.M.R., Almeida, E., 2016. Nutrient digestibility and ruminal fatty acid
357 metabolism in lambs supplemented with soybean oil partially replaced by fish oil blend.
358 *Anim. Feed. Sci. Technol.* 216, 30-39. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.09.007>.
- 359 Hall, M.B., 2009. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds:
360 comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *J.*
361 *AOAC Int.* 92, 42-49. <https://doi.org/10.1093/jaoac/92.1.42>.
- 362 Holtshausen, L., Chung, Y.H., Gerardo-Cuervo, H., Oba, M., Beauchemin, K.A., 2011.
363 Improved milk production efficiency in early lactation dairy cattle with dietary addition of
364 a developmental fibrolytic enzyme additive. *J. Dairy Sci.* 94, 899-907.
365 <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3573>.
- 366 Knowlton, K.F., Mckinney, J.M., Coob, C., 2002. Effect of a direct-fed fibrolytic enzyme
367 formulation on nutrient intake, partitioning, and excretion in early and late lactation

- 368 holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85, 3328-3335. <https://doi.org/10.3168/jds.S0022->
369 0302(02)74421-4.
- 370 Lammers, B.P., Buckmaster, D.R., Heinrichs, A.J., 1996. A simple method for the analysis of
371 particle sizes of forage and total mixed rations. *J. Dairy Sci.* 79, 922-928.
372 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76442-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76442-1).
- 373 Lopes, F., Cook, D.E., Combs, D.K., 2015b. Effects of varying dietary ratios of corn silage to
374 alfalfa silage on digestion of neutral detergent fiber in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*
375 98, 6291-6303. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8662>.
- 376 Lopes, F., Ruh, K., Combs, D.K., 2015a. Validation of an approach to predict total-tract fiber
377 digestibility using a standardized in vitro technique for different diets fed to high-producing
378 dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 2596-2602. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8665>.
- 379 Meale, S.J., Beauchemin, K.A., Hristov, A.N., Chaves, A.V., Mcallister, T.A., 2014.
380 Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve ruminant
381 production. *J. Anim. Sci.* 92, 427-442. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6869>.
- 382 Morgavi, D.P., Beauchemin, K.A., Nsereko, V.L., Rode, L.M., Iwaasa, A.D., Yang, W.Z.,
383 Macallister, T.A., Wang, Y., 2000. Synergy between ruminal fibrolytic enzymes and
384 enzymes from *trichoderma longibrachiatum*. *J. Anim. Sci.* 83, 1310-1321.
385 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74997-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74997-6).
- 386 Muck, R.E., Nadeau, E.M.G., Mcallister, T.A., Contreras-Govea, F.E., Santos, M.C., Kung Jr.,
387 L., 2018. J. Silage review: recent advances and future uses of silage additives. *J. Dairy Sci.*
388 101, 3980-4000. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839>.
- 389 Mullins, C.R., Mamedova, L.K., Brouk, M.J., Moore, C.E., Green, H.B., Perfield, K.L., Smith,
390 J.F., Harner, J.P., Bradford, B.J., 2012. Effects of monensin on metabolic parameters,
391 feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95, 1323-1336.
392 <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4744>.

- 393 National Research Council, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. seventh rev. ed. The
394 National Academies Press, Washington, DC.
- 395 Nsereko, V.L., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Furtado, A.F., Mcallister, T.A.,
396 Iwaasa, A.D., Yang, W.Z., Wang, Y., 2002. Effect of a fibrolytic enzyme preparation from
397 *Trichoderma longibrachiatum* on the rumen microbial population of dairy cows. *Can. J.*
398 *Microbiol.* 48, 14-20. <https://doi.org/10.1139/w01-131>.
- 399 Russell, J.C., Wilson, D.B., 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest
400 cellulose at low pH. *J. Dairy Sci.* 79, 1503-1509. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76510-4)
401 [0302\(96\)76510-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76510-4).
- 402 SAS Institute, 2012. SAS/STAT 9.1 User's Guide. Version 9.4. Cary, NC.
- 403 Schingoethe, D.J., Stegeman, G.A., Treacher, R.J., 1999. Response of lactating dairy cows to
404 a cellulase and xylanase enzyme mixture applied to forages at the time of feeding. *J. Dairy*
405 *Sci.* 82, 996-1003. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75319-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75319-1).
- 406 Sutton, J.D., Phipps, R.H., Beever, D.E., Humphries, D.J., Hartnell, G.F., Vicini, J.L., Hard,
407 D.L., 2003. Effect of method of application of a fibrolytic enzyme on digestive processes
408 and milk production in Holstein-Friesian cows. *J. Dairy Sci.* 86, 546-556.
409 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73633-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73633-9).
- 410 Tirado-Gonzalez, D.N., Miranda-Romero, L.A., Ruiz-Flores, A., Medina-Cuellar, S.E.,
411 Ramirez-Velarde, R., Tirado-Estrada, G., 2017. Meta-analysis: effect of exogenous
412 fibrolytic enzymes in ruminant diets. *J. Appl. Anim. Res.* 46, 771-783.
413 <https://doi.org/10.1080/09712119.2017.1399135>.
- 414 Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent
415 fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-
416 3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2).

- 417 Vicini, J.L., Bateman, M.K., Clark, J.H., Erdman, R.A., Phipps, R.H., Van Amburgh, M.E.,
418 Hartnell, G.F., Hintz, R.L., Hard, D.L., 2003. Effect of feeding supplemental fibrolytic
419 enzymes or soluble sugars with malic acid on milk production. *J. Dairy Sci.* 86, 576-585.
420 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73636-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73636-4).
- 421 Yousef, M.K., 1985. *Stress Physiology in Livestock*. CRC Press, Boca Raton.
- 422 Wang, Y., Mcallister, T.A., Rode, L.M., Beauchemin, K.A., Morgavi, D.P., Nsereko, V. L.,
423 Iwaasa, A.D., Yang, W., 2001. Effects of an exogenous enzyme prepatation on microbial
424 protein synthesis, enzyme activity and attachment to feed in the Rumen Simulation
425 Technique (Rusitec). *Br. J. Nutr.* 85, 325-332. <https://doi.org/10.1079/bjn2000277>.
- 426 Warner, A.C.I., 1962. Enumeration of rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiol.* 28, 119-128.
427 <https://doi.org/10.1099/00221287-28-1-119>.
- 428 Wildman, E.E., Jones, G.M., Wagner, P.E., Boman, R.L., Troutt, H.F., Lesch, T.N., 1982. A
429 dairy-cow body condition scoring system and its relationship to selected production
430 characteristics. *J. Dairy Sci.* 65, 495-501. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6)
431 [0302\(82\)82223-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(82)82223-6).
- 432 Zhou, M., Chung, Y.H., Beauchemin, K.A., Holtshausen, L., Oba, M., Mcallister, T.A., Guan,
433 L.L., 2011. Relationship between rumen methanogens and methane production in dairy
434 cows fed diets supplemented with a feed enzyme additive. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1148-
435 1158. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05126.x>

TABLES AND FIGURES

Table 1. Ingredient and nutrient composition (% of dry matter) and particle size distribution of diets on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)

	CTL	ENZ
Corn silage (51.8% NDF, 27.2% starch) ¹	48.3	
Oat hay (73.8% NDF) ²	3.9	
Soybean meal (48.8% crude protein)	11.8	
High-bypass soybean meal (49.8% crude protein) ³	4.0	
Whole cottonseeds	8.6	
Finely ground mature corn	20.6	
Limestone	0.93	
Sodium bicarbonate	0.93	
Magnesium oxide	0.23	
Salt	0.23	
Minerals and vitamins ⁴	0.47	
Crude protein	15.9	15.7
Neutral detergent fiber (NDF)	36.6	36.4
NDF from corn silage	25.0	24.9
NDF from oat hay	3.0	3.0
Starch	29.4	29.7
Ether extract	5.5	5.5
Ash	6.3	6.3
Non-fiber carbohydrates ⁵	35.7	36.1
Dry matter, % of as fed	59.2	59.0
Feed particles > 19 mm, ⁶ % of as fed	26.1 ± 5.9	24.5 ± 5.0
Feed particles 8-19 mm, % of as fed	34.3 ± 4.6	35.5 ± 3.3
Feed particles < 8 mm, % of as fed	39.6 ± 2.8	40.0 ± 2.5

¹Mean ± SD of 8 samples (1/week). Particle size (% of as fed): > 19 mm = 21.9 ± 3.5, 8-19 mm = 56.1 ± 3.5, < 8 mm = 22.0 ± 1.5.

²Mean ± SD of 8 samples (1/week). Particle size (% of as fed): > 19 mm = 64.2 ± 11.6, 8-19 mm = 19.2 ± 6.7, < 8 mm = 16.6 ± 5.3.

³SoyPass (SoyPass BR, Cargill Agrícola, Uberlândia, Brazil).

⁴23.0% Ca, 15.6% P, 2.55% Mg, 3.9% S, 120 ppm Co, 2,000 ppm Cu, 5,000 ppm Mn, 12,000 ppm Zn, 83 ppm Se, 200 ppm I, 1,000 KUI/kg Vit A, 220 KUI/kg Vit D, 6,200 UI/kg Vit E.

⁵NFC = 100 - (Crude protein + NDF + Ether extract + Ash).

⁶Mean ± SD of 16 samples (2/week).

Table 2. Total tract apparent digestibility of dry matter (DM), organic matter (OM), neutral detergent fiber (NDF), Non-NDF OM, and starch, digestible OM intake (DOMI), feed efficiency during digestibility measurements, intake and defecation of intact corn kernels, and fecal yield, composition, and viscosity on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)

	CTL	ENZ	SEM	<i>P</i> -value
DM D, % of intake	66.4	65.2	3.12	0.71
OM D, % of intake	70.0	66.5	2.49	0.32
NDF D, % of intake	44.5	47.6	2.61	0.44
Non-NDF OM D, % of intake	86.4	84.7	1.24	0.35
Starch D, % of intake	94.0	93.1	0.76	0.38
DOMI, kg/d	15.6	15.3	1.39	0.90
ECM/DOMI, ¹ kg/kg	1.63	1.92	0.183	0.32
Kernels intake, N/d	2,857	2,851	197.4	0.97
Kernels in feces, N/d	168	177	36.2	0.81
Kernels in feces, % of intake	5.9	6.2	1.31	0.47
Fresh feces, kg/d	49.4	50.3	3.02	0.92
Fecal DM, % of fresh	13.7	13.9	0.23	0.60
Fecal starch, % of DM	5.6	6.1	0.59	0.55
Fecal NDF, % of DM	64.5	64.0	0.72	0.64
Fecal viscosity, cP	15.8	15.0	1.52	0.69

¹Energy-corrected milk/DOMI.

Table 3. Dry matter intake (DMI), lactation performance, milk urea-N (MUN), feed efficiency, body weight (BW) and condition score (BCS), and milk somatic cell count (SCC) on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)

	CTL	ENZ	SEM	<i>P</i> -value ¹	
				Trt	Trt×Wk
DMI, kg/d	21.2	20.7	1.02	0.66	0.96
Milk, kg/d	26.4	26.3	0.52	0.72	0.44
ECM, ² kg/d	25.0	25.0	0.63	0.98	0.56
Fat, kg/d	0.900	0.910	0.0215	0.68	0.63
Fat, %	3.40	3.52	0.057	0.07	0.59
Protein, kg/d	0.825	0.820	0.0156	0.69	0.86
Protein, %	3.14	3.16	0.023	0.45	0.04
Lactose, kg/d	1.180	1.176	0.0275	0.86	0.33
Lactose, %	4.45	4.47	0.022	0.47	0.76
Solids, kg/d	3.155	3.150	0.0657	0.93	0.61
Solids, %	11.94	12.10	0.057	0.02	0.65
MUN, mg/dL	17.8	18.0	0.31	0.65	0.10
Milk/DMI, kg/kg	1.33	1.34	0.097	0.90	0.80
ECM/DMI, kg/kg	1.24	1.29	0.091	0.59	0.82
BW, kg	653	655	2.4	0.38	0.91
BW change, ³ kg/d	0.261	0.335	0.0685	0.42	
BCS, 1 to 5	3.18	3.17	0.127	0.76	0.19
Linear SCC, ⁴ 0 to 9	3.23	3.10	0.415	0.77	0.36

¹*P* < 0.01 for the effect of experimental week for all variables (weeks 1 to 8). Trt = Treatment. Trt×Wk = Interaction between Trt and week.

²Energy-corrected milk.

³Slope of the linear regression of body weight over weeks 0 to 8.

⁴Equivalency of the Linear SCC scores. 3.23 = 117,000 cells/mL and 3.10 = 107,000 cells/mL.

Table 4. Molar proportions of total volatile fatty acids (VFA), pH, and total protozoa concentration in reticular fluid, urinary allantoin excretion, and allantoin/digestible organic matter intake (DOMI) on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)

	CTL	ENZ	SEM	<i>P</i> -value
Acetate, molar % of total VFA	64.9	66.2	0.65	0.15
Propionate, molar % of total VFA	19.7	18.5	0.55	0.10
Butyrate, molar % of total VFA	11.2	11.1	0.29	0.84
Acetate/Propionate	3.29	3.59	0.10	0.10
Protozoa, $\times 10^4$ /mL	8.8	10.2	1.02	0.26
Allantoin, mmol/d	334	298	51.7	0.62
Allantoin/DOMI, mmol/kg	21.6	24.1	4.61	0.70

Table 5. Dry matter intake (DMI) and orts, proportion of intake in periods of the day, starch, neutral detergent fiber (NDF), and particle size sorting behaviors, and chewing behavior on treatments Control (CTL) and Enzyme (ENZ)

	CTL	ENZ	SEM	<i>P</i> -value ¹	
				Trt	Trt×Wk
DMI, kg/d	22.2	21.9	1.69	0.85	0.43
Orts, % of offered diet	9.4	10.1	0.61	0.42	0.14
	% of daily intake				
0700 to 1300 h	39.7	41.1	3.57	0.69	0.35
1300 to 1900 h	46.5	42.7	2.56	0.20	0.75
1900 to 0700 h	13.8	16.2	3.28	0.29	0.12
	Observed/Predicted, ² %				
Starch sorting	105	104	0.76	0.86	0.49
NDF sorting	92	92	0.86	0.58	0.51
	0700 to 1300 h				
> 19 mm	98	96	3.9	0.69	0.21
8-19 mm	84	88	1.6	0.16	0.14
< 8 mm	110	109	2.0	0.85	0.13
	1300 to 1900 h				
> 19 mm	57	60	4.3	0.63	0.21
8-19 mm	104	101	1.6	0.20	0.22
< 8 mm	121	123	4.3	0.66	0.67
	1900 to 0700 h				
> 19 mm	81	78	4.1	0.68	0.82
8-19 mm	105	105	5.9	0.99	0.34
< 8 mm	113	115	6.4	0.80	0.54
Eating, min/d	302	308	9.6	0.63	0.89
Rumination, min/d	446	454	11.6	0.61	0.86
Chewing, ³ min/d	748	762	16.2	0.52	0.96
Eating, min/kg DMI	13.6	14.0	1.45	0.32	0.90
Rumination, min/kg DMI	20.0	20.7	2.72	0.43	0.96
Chewing, ³ min/kg DMI	33.6	34.7	4.31	0.45	0.94
First meal duration, min	74.2	65.8	5.75	0.23	0.66
Meals/d	8.6	8.7	0.40	0.86	0.71
Meal duration, min	35.0	35.4	1.54	0.80	0.56
Interval between meals, min	157	149	6.3	0.37	0.75
Ruminations/d	11.2	11.1	0.37	0.94	0.38
Rumination duration, min	40.0	41.0	1.41	0.73	0.38
Interval between ruminations, min	101	100	4.4	0.94	0.37

¹*P* < 0.01 for the effect of experimental week for all variables (weeks 4 and 8). Trt = Treatment. Trt×Wk = Interaction between Trt and week.

²< 100% = rejection, > 100% = preferential intake, = 100% = no selection. Diameter of sieves of the Penn State Particle Separator.

³Eating + Rumination.

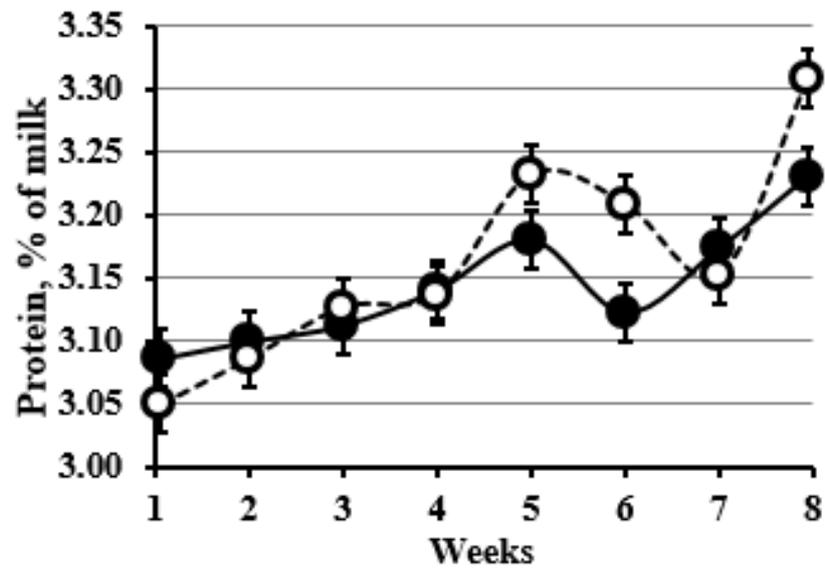


Figure 1. Milk protein concentration on treatments Control (—●—) and Enzyme (---○---). $P = 0.45$ for treatment, $P = 0.04$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.02$ on wk 6, $P = 0.04$ on wk 8.

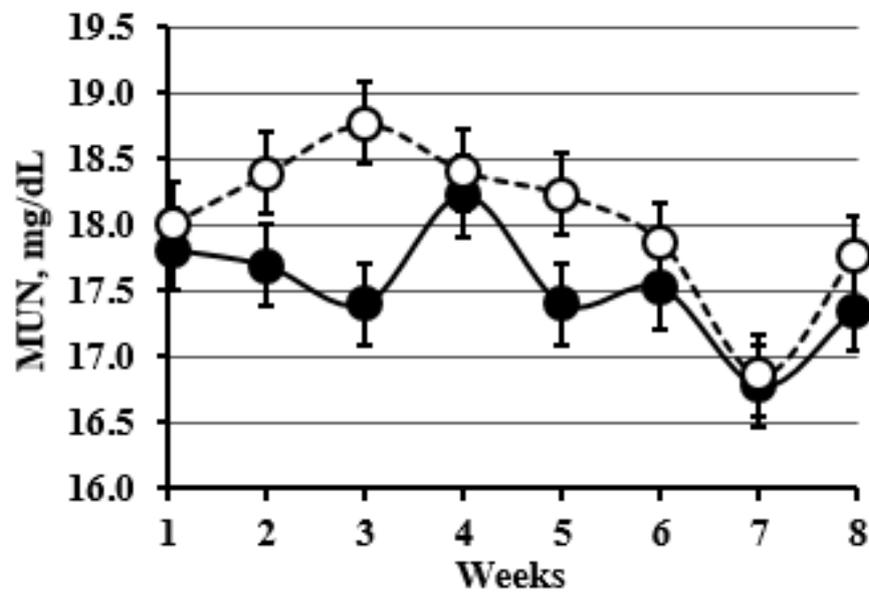


Figure 2. Milk urea-N concentration (MUN) on treatments Control (—●—) and Enzyme (---○---). $P = 0.65$ for treatment and $P = 0.10$ for the interaction between treatment and week. Slice option: $P = 0.05$ on wk 3.

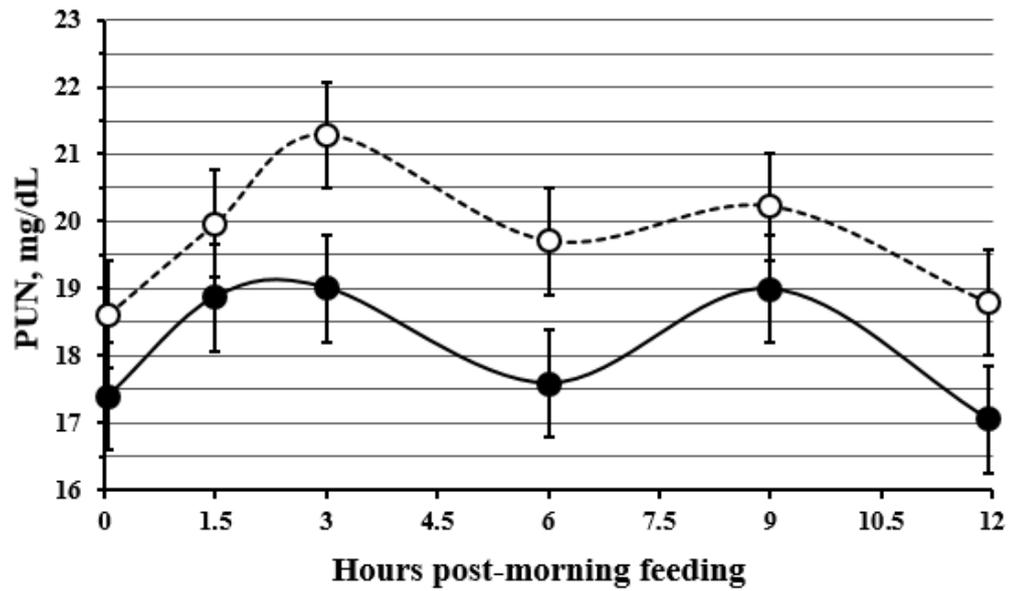


Figure 3. Plasma urea-N (PUN) on treatments Control (—●—) and Enzyme (---○---). $P = 0.06$ for treatment and $P = 0.10$ for the interaction between treatment and hour. Slice option: $P = 0.06$ at 3 h and $P = 0.08$ at 6 h post-feeding.

ARTIGO 2 - EFICÁCIA DE ADITIVOS QUÍMICOS SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO E A ESTABILIDADE AERÓBIA DA DIETA DE VACAS LEITEIRAS

(VERSÃO PRELIMINAR)

ARTIGO PREPARADO DE ACORDO COM AS NORMAS PARA SUBMISSÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE ZOOTECNIA.

J. P. Santos*, V. C. Souza*, E. F. Barbosa*, R. B. Silva‡, C. L. S. Ávila*, R. A. N. Pereira†, L. F. Greco[¥], M. N. Pereira*¹

*Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Lavras, MG, 37200-900, Brasil

‡Centro de Pesquisa Better Nature, Ijaci, MG, 37.218-000, Brasil.

†Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Sul de Minas, Lavras, MG, 37200-900, Brasil

[¥]Kemin do Brasil, Indaiatuba, Brasil.

RESUMO

A estabilidade aeróbia da dieta pode afetar o manejo alimentar e o CMS de ruminantes. Avaliamos o efeito de dois produtos comerciais (Kemin, Brasil) em três dosagens na estabilidade aeróbia de uma TMR à base de silagem de milho (50,5% MS, pH 5,52). Os tratamentos foram: Controle (CTL), propionato de cálcio (PC. Shield Base Feedgrade Dry, 100% propionato de cálcio) com doses de 1 (PC1), 1,5 (PC1,5) ou 2 (PC2) kg/ton, ou uma mistura líquida de inibidores de crescimento microbiano (FC. Fresh Cut Plus Líquido, ácidos acético, benzoico e propiônico, hidróxido de amônio, polisorbato) com doses de 1 (FC1), 1,5 (FC1,5) ou 2 (FC2) L/tonelada. Água (CTL) ou produtos diluídos em água (30 mL) foram misturados a 5 kg de TMR e colocados em 6 baldes / tratamento. Um balde com cada tratamento foi colocado em uma das 6 prateleiras em uma sala com ambiente controlado ($29,1 \pm 1,7$ °C) por 48 h. As temperaturas da TMR e em cada prateleira foram mensuradas em intervalos de 30 min. A microbiologia foi avaliada às 24 h. O modelo estatístico continha os efeitos da prateleira e do tratamento. Os dados obtidos ao longo do tempo foram analisados como medidas repetidas. Os contrastes compararam o CTL com outros tratamentos. Os tratamentos FC1.5 (1820 min) e FC2 (1825 min) atrasaram ($P \leq 0,05$) o momento da temperatura máxima da TMR em relação ao CTL (1745 min). O valor da temperatura máxima (46,7 °C) e a estabilidade aeróbia (723 min para a temperatura de TMR + 2°C que o ambiente) não diferiram ($P \geq 0,28$). Os tratamentos FC1.5 (32.4 °C) e FC2 (32.2 °C) reduziram a temperatura de 0-24 h da TMR em relação ao CTL (34,8 °C). Os aditivos não afetaram ($P \geq 0,63$) a temperatura de 24-48 h (44,4 °C). As contagens (log ufc/g) de bactérias aeróbias e formadoras de esporos foram reduzidas ($P \leq 0,05$) por PC2 (4,77 e 4,11) e FC1,5 (3,86 e 3,27) e tendência ($P \leq 0,07$) a serem reduzidas por FC1 (4,98 e 4,24) em relação aos CTL (6,85 e 5,74). A contagem de leveduras tendeu ($P = 0,09$) a ser reduzida em FC1 (0,98 vs 2,71). A contagem de fungos filamentosos foi de 3,35 para CTL e foi reduzida ($P \leq 0,05$) por PC2 (1,59), FC1 (1,37), FC1,5 (1,07) e FC2 (1,73) e tendeu ($P = 0,06$) a reduzir por PC1,5 (1,85). O produto FC nas doses mais altas reduziu a temperatura da TMR de 0 a 24 h e foi mais inibidor do crescimento microbiano do que o produto PC.

Palavras-chave: Ácido propiônico. Estabilidade aeróbia. Estabilidade da ração mista total. Propionato de cálcio.

1 INTRODUÇÃO

A estabilidade aeróbia é designada como o tempo necessário para que silagem ou a ração mista total (TMR) aumente 2 °C em relação à temperatura ambiente (KUNG, 1998), ou seja, sem aquecimento devido à atividade microbiana. Com o desenvolvimento dos microrganismos ocorre a produção de calor e conseqüentemente aquecimento da TMR, podendo esse processo ocorrer no período de 12 h a partir da homogeneização dos ingredientes (KUNG, 2010). O aquecimento gera conseqüências negativas como redução no consumo de matéria seca (CMS) e de nutrientes, com queda na produção de leite (GHELLER et al., 2020). Além disso, pode ocorrer a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos ou indesejáveis afetando negativamente a qualidade e segurança do leite, bem como a saúde e o desempenho animal (CAVALLARIN et al., 2011; OGUNADE et al., 2016).

A estabilidade aeróbia da TMR no cocho está relacionada com a estabilidade das silagens e dos ingredientes utilizados na confecção da TMR. A mistura dos ingredientes imediatamente antes do fornecimento aos animais, expõem a dieta ao oxigênio, além de fornecer substrato para os microrganismos presentes nos alimentos. O fornecimento da TMR em intervalos mais curtos e a remoção das sobras do fornecimento anterior, reduziria os problemas de quebra da estabilidade, porém resulta em aumento dos custos de produção. Uma estratégia é a utilização de aditivos, como os ácidos orgânicos, que visam aumentar a estabilidade aeróbia desses alimentos (GHELLER et al., 2020).

A utilização de aditivos químicos com objetivo de aumentar estabilidade aeróbia tem sido bastante relatada em silagens de gramíneas (STRYSZEWSKA e PYS 2006; TYROLOVÁ, BARTON e LOUCKA 2017; KUNG et al., 2018; BERNARDES et al., 2014), silagens de grãos cereais úmidos ou reconstituídos (ADESOGAN et al., 2003; Kung et al., 2004; DA SILVA et al., 2015; MORIEL et al., 2016; SANTOS et al., 2019) e também em silagens de dieta total (CHEN et al., 2015, 2016; YUAN et al., 2015). No entanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos com intuito de avaliar a aplicação desses aditivos no momento da homogeneização dos ingredientes sobre a estabilidade aeróbia da TMR no cocho (KUNG et al., 1998; KUNG, 2005, SEPPALA et al., 2013; 2016). Os ácidos orgânicos têm o potencial de melhorar a estabilidade aeróbia devido à ação da sua forma não dissociada que consegue atravessar a membrana da célula microbiana por transporte passivo alterando o pH citoplasmático (GHELLER et al., 2020), conseqüentemente afetando o metabolismo e a pressão osmótica da célula, o que impossibilita seu desenvolvimento (LAMBERT e STRATFORD, 1999).

A hipótese dessa pesquisa é que a adição dos aditivos químicos melhore a estabilidade aeróbia e reduza o aquecimento das dietas no cocho. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da associação entre substâncias químicas inibidoras de microrganismos deterioradores sob a população microbiana e estabilidade aeróbia de TMR baseadas em silagem de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Dieta, tratamentos e unidades experimentais

A dieta utilizada (TMR) foi homogeneizada em misturador estacionário vertical (Unimix 1200. Casale Equipamentos Ltda, São Carlos, SP), sendo composta pelos seguintes ingredientes (% da MS): 35,5% de silagem de milho (40% de MS), 13,3% de silagem de sorgo (30% de MS), 2,7% de feno de aveia (87,6% de MS), 8,2% de caroço de algodão, 13,1% de farelo de soja, 14,9% de milho reidratado ensilado (61,0% de MS), 5,9% de resíduo de destilaria com solutos (FlexyPro Cargill), 3,2% de polpa cítrica e 3,1% de premix com minerais, vitaminas e aditivos (Bicarbonato de sódio, óxido de magnésio, levedura morta, adsorvente de micotoxinas, beta caroteno). O teor de MS da dieta foi 50,5% da matéria natural. A composição da dieta em nutrientes foi (% da MS): 16,2 de proteína bruta, 35,0% de fibra em detergente neutro, 4,8% de extrato etéreo, 37,3% de carboidratos não-fibrosos, 24,7% de amido.

Os sete tratamentos foram: Controle (CTL. Água destilada), o produto sólido propionato de cálcio (PC. Shield Base Feedgrade Dry; 100% propionato de cálcio. Kemin do Brasil, Indaiatuba, SP) nas doses 1,0 kg/ton (PC1), 1,5 kg/ton (PC1,5) e 2,0 kg/ton (PC2) e o produto líquido composto por uma mistura de antifúngicos (FC. Fresh Cut Plus Líquido; ácido acético, ácido benzoico, ácido propiônico, hidróxido de amônio, polisorbato. Kemin do Brasil, Indaiatuba, SP) nas doses 1,0 L/ton (FC1), 1,5 L/ton (FC1,5) e 2,0 L/ton (FC2). O produto líquido foi diluído em 30 mL de água destilada e foi aspergido sobre 5 kg da dieta com um pulverizador manual. O produto sólido foi homogeneizado a 5 kg da dieta que foi posteriormente pulverizada com 30 mL de água destilada.

Os tratamentos foram avaliados em duas rodadas experimentais não consecutivas conduzidas em sala sem ventilação com temperatura mantida ao redor de 30°C por aquecedor elétrico. As unidades experimentais foram baldes de 30 L (35 cm de altura e 29 cm de diâmetro) contendo 5 kg da dieta com os tratamentos. Foram avaliados 3 baldes por tratamento em cada rodada experimental, totalizando 21 unidades experimentais por rodada (N=6 baldes/tratamento). Uma unidade experimental de cada tratamento foi colocada em uma de três prateleiras de estante (7 baldes por prateleira) no centro da sala ficando a 20 cm, 80 cm ou 150 cm do piso. Prateleira/rodada experimental (1 a 6) foi considerado como bloco no modelo de análise estatística visando ajustar para a variação da temperatura ambiente dentro da sala climatizada.

2.2 Temperatura e pH da dieta

Para o monitoramento da temperatura das dietas e do ambiente de cada prateleira a intervalos de 30 minutos por 48 horas foram utilizados dataloggers (Modelo MX-ST-S-8-L iMINI. Cryopak Verification Technologies, Buchanan, EUA). Um datalogger foi inserido no centro da dieta em cada balde e outro foi deixado sobre cada uma das três prateleiras. A estabilidade aeróbia da dieta foi definida como o momento que a temperatura da dieta excedeu 2 °C da temperatura ambiente mensurada na prateleira (Moran, et al., 1996). A temperatura do ambiente nas duas rodadas experimentais foi $29,1 \pm 1,7$ °C (Média \pm DP de 6 termômetros nas prateleiras a cada 30 minutos por 48 h).

Nos tempos 24 h e 48 h do início do ensaio, uma amostra da dieta foi coletada no centro da massa para mensuração do pH. Amostras de 25 g da dieta foram misturadas a 225 mL de água destilada e agitadas durante 4 min a 200 rpm em agitador orbital (Modelo 430. Nova Ética, São Paulo, SP). A partir do extrato obtido, o pH foi determinado (Phmetro Digimed DM 20. Digicrom Analítica, São Paulo, SP).

2.3 Microbiologia

Amostras de 25 g da dieta foram obtidas no tempo 24 h, inseridas assepticamente em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e agitadas durante 20 minutos a 200 rpm em agitador orbital (Modelo 430. Nova Ética, São Paulo, SP). A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} . As populações de bactérias aeróbias totais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias formadoras de esporos foram determinadas por plaqueamento em superfície, tomando-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata.

A contagem de bactérias aeróbias totais foi realizada com o meio Ágar Nutriente (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas à 37 °C e a contagem foi realizada após 48 h. A contagem de fungos filamentosos e leveduras foi pelo meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) em incubação a 28 °C. A contagem de leveduras foi realizada após 72 h e para fungos filamentosos após 120 horas. As bactérias aeróbias formadoras de esporos foram enumeradas em uma amostra do extrato aquoso mantida a 80 °C por 10 min e diluições decimais adicionais foram plaqueadas em meio Agar Nutriente (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubadas a 37 °C por 72 h.

2.4 Análise estatística

Os dados de temperatura e pH da dieta obtidos ao longo do tempo foram analisados com o PROC MIXED do SAS (versão 9.3, 2011, SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo estatístico continha os efeitos fixos de bloco (1 a 6), tratamento (CTL, PC1, PC1,5, PC2, FC1, FC1,5 e FC2) e tempo (min) e a interação entre tratamento e tempo. Balde aninhado em tratamento foi definido como aleatório. A melhor estrutura de covariância foi definida pelo critério Bayesiano de Schwarz entre autoregressiva de primeira ordem e simetria composta. Os graus de liberdade foram calculados usando a opção Kenward-Roger. Modelo similar foi adotado para variáveis mensuradas uma vez (Temperatura máxima, momento da temperatura máxima, estabilidade aeróbia, temperatura e pH nos tempos 24 h e 48 h e contagens microbiológicas) removendo o efeito de tempo e sua interação com tratamento do modelo anterior. Contrastes ortogonais foram realizados para comparar os tratamentos. A significância foi declarada a $P \leq 0,05$ e as tendências a $P \leq 0,15$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Silagens de milho e sorgo permitem uma rápida produção de ácido lático durante o processo de fermentação, com conseqüente queda no pH. Esse perfil de fermentação é desejável e adequado para uma melhor conservação do material, mas não evita a deterioração aeróbia (MUCK; MOSER e PITT, 2003). Silagens com perfil de fermentação adequado apresentam altos teores de ácido lático e carboidratos solúveis em água (CSA) remanescentes, que são utilizados como substrato preferencial para o crescimento de leveduras e fungos filamentosos, após a abertura do silo, além de apresentarem baixa quantidade de produtos inibidores de microrganismos deterioradores, como por exemplo o ácido acético (TABACCO et al., 2009). A TMR utilizada em nosso estudo continha aproximadamente 35% de silagem de milho e 13% de silagem de sorgo em sua composição, o que a predispõe a uma maior probabilidade de deterioração e menor estabilidade aeróbia no cocho, além disso a temperatura em que essas TMR's foram armazenadas estão acima das temperaturas utilizadas em alguns trabalhos para mensurar o efeito de aditivos químicos sob a estabilidade aeróbia de silagens e TMR's (SEPPALA et al., 2013; DA SILVA et al.; 2015).

A nossa hipótese era que os estabilizantes melhorassem a estabilidade aeróbia da TMR, com redução da deterioração aeróbia. Entretanto, nenhum dos aditivos e doses testadas foram capazes de melhorar a estabilidade aeróbia ou impactar na temperatura máxima atingida pela TMR nos tratamentos. Sepalla et al. (2013) encontram aumento de 5,4% na estabilidade aeróbia de TMR's utilizando aditivos a base de ácido propiônico nas doses de 2 e 3 L/ton e aumento de 30% quando 4 L/ton foram utilizados, sugerindo que doses acima de 5 L/ton são imprescindíveis na prática. Os tratamentos FC1,5 e FC2 ($P \leq 0,05$) adiaram o tempo em que a temperatura máxima da TMR foi atingida relativamente ao CTL, sem, no entanto, afetar a estabilidade aeróbia que foi em média de 723 min para os tratamentos (Tabela 1).

A temperatura de avaliação dos tratamentos ($29,1 \pm 1,7$ °C) permaneceu dentro da faixa em que as silagens são mais suscetíveis à deterioração e multiplicação de leveduras (ASHBELL et al., 2002). Isso pode ter favorecido o desenvolvimento de microrganismos deterioradores e limitado o potencial efeito das doses e aditivos utilizados nesse estudo. O grau em que as silagens se deterioraram no silo e a temperatura ambiente determinará as doses de aditivos necessárias para impedir a intensidade e extensão da deterioração da TMR no cocho (KUNG et al., 1998). Assim, se a temperatura ambiente favorece o desenvolvimento de microrganismos deterioradores e/ou os alimentos apresentam certo grau de deterioração antes da homogeneização da TMR, altos níveis de aditivos podem ser necessários para evitar a extensão

deterioração no cocho (KUNG, 2010). O tratamento FC1,5 reduziu ($P = 0,05$) a temperatura da dieta no tempo 24 h relativamente ao CTL e o tratamento FC2 reduziu ($P \leq 0,01$) a temperatura da dieta no tempo 48 h relativamente ao CTL (Tabela 1). O tratamento PC2 tendeu ($P = 0,08$) a aumentar o pH da TMR em 24 horas em relação ao controle. A baixa solubilidade desse sal pode ter impactado na eficácia em reduzir o pH em altos níveis de aplicação ou pode ser parcialmente atribuído ao aumento da capacidade tampão que o PC possui (KUNG et al., 2010; DONG et al., 2017). Kung et al. (1998) também observaram que a alta dose de propionato de cálcio resultou em sobras com maior pH após permanecerem 24 h no cocho.

Os tratamentos FC1 e FC1,5 reduziram ($P \leq 0,02$) o pH da dieta em 48 h relativamente ao CTL (Tabela 1) e os tratamentos FC1,5 e FC2 reduziram ($P \leq 0,04$) a temperatura entre 0 e 24 h relativamente ao CTL. Não houve diferença ($P \geq 0,38$) na temperatura da dieta entre 0 e 24 h entre as doses dos estabilizantes e também não houve efeito de tratamento ($P \geq 0,49$) sobre a temperatura da dieta entre 24 e 48 h (Tabela 2). A Figura 1 relata a temperatura da dieta e do ambiente ao longo de 48 h. É possível observar uma tendência dos estabilizantes em reduzir a temperatura da dieta nas primeiras 24 h em relação ao CTL, porém sem diferenças estatísticas entre os tratamentos.

A eficácia do ácido propiônico e seus sais está intimamente relacionada à sua solubilidade na água. Quanto mais forte a ligação entre a base e o ácido, menos solúvel o produto é, portanto, menos eficaz na inibição de microrganismos deterioradores. Entre os sais, o propionato de amônio é mais solúvel em água (90%), seguido pelo propionato de sódio (25%) e propionato de cálcio (5%) (KUNG, 2010). Os ácidos orgânicos podem inibir o desenvolvimento de microrganismos pela redução do pH do meio externo ou por ação da sua forma não dissociada que consegue atravessar a membrana microbiana por transporte passivo, devido a sua solubilidade em lipídeos, alterando o pH citoplasmático e consequentemente afetando o metabolismo e a pressão osmótica da célula microbiana o que consequentemente inibe seu desenvolvimento (LAMBERT e STRATFORD, 1999; RUSSEL, 1992).

O aditivo químico foi capaz de reduzir a contagem de bactérias aeróbias em relação ao controle com diferenças significativas para o PC2 e FC1,5. O tratamento FC2 apresentou maior contagem de bactérias aeróbias, o que não era esperado. No entanto, alguns microrganismos possuem mecanismos adaptativos quando em condições de estresse extremo (WILKS et al., 2009; STRATFORD et al., 2013; PANDEY et al., 2016), o que pode resultar em efeitos quadráticos na contagem de microrganismos quando doses crescentes de ácido propiônico são testadas (MOON, 1983; DONG et al., 2017). Houve tendência de queda ($P \leq 0,11$) para reduzir a contagem de bactérias formadoras de esporos da dieta relativamente ao CTL nos tratamentos

PC2 e FC1 (Tabela 3). Os tratamentos PC2 e FC1 apresentaram tendência à reduzir a contagem de leveduras e fungos filamentosos da dieta em relação ao CTL.

As leveduras são as principais responsáveis pelo aparecimento da deterioração aeróbia de silagens e da TMR (MCDONALD et al., 1991) e existe uma correlação negativa entre estabilidade aeróbia e contagem de leveduras (WEISS et al., 2016). A associação de princípios ativos dos aditivos químicos apresenta efeito sinérgico quando comparado a utilização isolada (MOON, 1983; PELÁEZ et al., 2012). Os mecanismos de inibição dos princípios ativos podem ser diferentes e a ação conjunta leva a um ganho associativo comparado a utilização isolada de um princípio ativo por si só (WOOLFORD, 1984), o que está de acordo com a menor contagem de fungos filamentosos em relação ao CTL nos tratamentos FC1, FC1,5 e FC2.

A composição dos produtos e as doses recomendadas devem ser avaliadas em condições diversas para que sejam realmente efetivos em situações em que a temperatura favorece o crescimento de microrganismos deterioradores ou ainda quando são utilizados ingredientes para confecção das TMR's que apresentem algum grau de deterioração aeróbia.

4 CONCLUSÃO

O estabilizantes não melhoraram a estabilidade aeróbia das TMR's. A composição dos produtos baseados em ácidos orgânicos e as doses de aplicação devem ser avaliadas e experimentos *in vivo* com vacas em lactação são necessários para avaliar o efeito dos estabilizantes e doses sobre o consumo de matéria seca e o desempenho leiteiro, principalmente durante períodos quentes do ano.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T.; SALAWU, M. B.; ROSS, A. B.; DAVIES, D. R.; BROOKS, A. E. Effects of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* and *Leuconostoc mesenteroides* or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of crimped wheat grains. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1789-1796, 2003.
- ASHBELL, G.; WEINBERG, Z. G.; HEN, Y; FILYA, I. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 28, n. 5, p. 261-263, may. 2002.
- BERNARDES, T. F.; DE OLIVIERA, I. L.; LARA M. A. S.; CASAGRANDE, D. R.; AVILA C. L. S.; PEREIRA, O. G. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass Forage Science**, v. 70, p. 491-498, 2014.
- CAVALLARIN, L.; TABACCO, E.; ANTONIAZZI S.; BORREANI, G. Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure. **J. Sci. Food Agric.** v. 91, p. 2419-2425, 2011.
- CHEN, L.; GUO, G; YUAN, X. J.; ZHANG, J.; LI, J. F.; SHAO, T. Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1678-1685, 2016.
- CHEN, L.; YUAN, X.; LI, J.; WANG, S.; DONG, Z.; SHAO, T. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and *in vitro* gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15(7), p. 1592-1600, 2015.
- DA SILVA, T. C.; SMITH, M. L.; BARNARD, A. M.; KUNG JR, L. The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn. **Journal of Dairy Science**, vol. 98, 2015, p. 8904-8912. 2015.
- DONG, Z.; YUAN, X.; WEN, A.; DESTA, S. T.; SHAO, T. Effects of calcium propionate on the fermentation quality and aerobic stability of alfalfa silage. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, v. 30, p. 1278-1284, 2017.
- GHELLER, L. S., GHIZZI, L. G., MARQUES, J. A., TAKIYA, C. S., GRIGOLETTO, N. T. S., DIAS, M. S. S., RENNÓ, F. P. Effects of organic acid-based products added to total mixed ration on performance and ruminal fermentation of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 261, p. 114406. 2020. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114406
- KUNG JR., L., Aerobic stability of silages. In: Proceedings of the Conference on Silage for Dairy Farms, Arrisburg
Chttp://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/05AerobicStability.pdf (cited 28.10.19). 2005.

KUNG JR., L.; STOUGH, E. C.; MCDONELL, E. E.; SCHMIDT, R. J.; HOFHERR, M. W.; REICH, L. J.; KLINGERMAN, C. M. The effect of wide swathing on wilting times and nutritive value of alfalfa haylage. **Journal of Dairy Science**. v. 93, p. 1770-1773, 2010.

KUNG, L. JR.; MEYERS, C. L.; NEYLON, J. M.; TAYLOR, C. C., LAZARTIC, J. A.; MILLS, J. A.; WHITER, A. G. The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and wholecrop barley. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1310-1316, 2004.

KUNG, L. JR.; SMITH, M. L.; SILVA, E. B.; WINDLE, M. C.; SILVA T. C.; POLUKIS, S. A. An evaluation of the effectiveness of a chemical additive based on sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-12, 2018.

KUNG JR, L.; SHEPERD A. C.; SMAGALA, A. M.; ENDRES, K. M; BESSETT, C. A.; RANJIT, N. K.; GLANCEY, J. L. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal Dairy Science**. v. 81, p. 1322-1330, 1998.

LAMBERT, R.J., STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. *Journal. Applied Microbiology*. 86, 157-164.

MCDONALD, P.; HENDERSON, A. R.; HERON, S. J. E. The biochemistry of silage. 2nd ed. Chalcombe Publ., Marlow, England. 1991.

MOON N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 453-460, 1983.

MORAN, J. P.; WE INBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T. R. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: Jones D.I.H., Jones R., Dewhurst R. and Merry R.J. (eds) **Proceedings** of the XI International Silage Conference, Aberystwyth, p. 162-163, 1996.

MORIEL, P.; PICCOLO, M. B.; ARTIOLI, L. F. A.; SANTOS, G. S.; POORE, M. H.; FERRARETTO, L. F.; Method of propionic acid-based preservative addition and its effects on nutritive value and fermentation characteristics of wet brewers grains ensiled in the summertime. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, p. 591-597, 2016.

MUCK, R. E.; MOSER, M. R.; PITT, R. E. Postharvest factors affecting ensiling. In: BUXTON, D. R.; MUCK, R. E. HARRISON, J. H. (Co-ed) *Silage Science and technology*. Madison: ASA, Cap. 6. P. 251-304, 2003.

OGUNADE, I. M.; ARRIOLA, K. G.; JIANG Y.; DRIVER, J. P.; STAPLES, C. R.; ADESOGAN, A. T. Effects of 3 sequestering agents on milk aflatoxin M1 concentration and the performance and immune status of dairy cows fed diets artificially contaminated with aflatoxin B1. **J. Dairy Sci**. v. 99, p. 6263-6273, 2016.

PANDEY, R.; VISCHER, N. O. E.; SMELT, J. P. P. M., VAN BEILEN, J.W.A.; TER BEEK, A.; DE VOS, W.H.; BRUL, S.; MANDERS, E. M. M., Intracellular pH response to

weak acid stress in individual vegetative *Bacillus subtilis* cells. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 82, p. 6463-6471. 2016.

PELÁEZ, León A.M. et al. Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. **Food Control.** [s.l.], v. 24, n. 1-2, p. 177 -183, março, 2012.
 PANDEY, R.; VISCHER, N. O. E.; SMELT, J. P. P. M.; VAN BEILEN, J. W. A.; BEEK, A. T.; DE VOS, W. H.; BRUL, S.; MANDER, E. M. M. Intracellular pH response to weak acid stress in individual vegetative *Bacillus subtilis* cells. **Applied Environmental Microbiology**, v. 82, p. 6463-6471, 2016.

RUSSEL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology.** V. 73, p. 363-370, 1992.

SANTOS, W. P.; SALVATI, G. G. S.; SILVEIRA, J. M.; SALVO, P. A. R.; ARTHUR, B. A. V.; GRITTI, V. C.; OLIVEIRA, K. S.; FERRAZ, M. V. JR.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. The effect of length of storage and sodium benzoate on the nutritive value of reconstituted sorghum grain silages for dairy cows. **Journal of Dairy Science.** 102 In press, 2019.

SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., version 9.3 ed, Cary, NC.
 SEPPÄLÄ, A.; HEIKKILÄ, T.; MÄKI, M.; RINNE, M. Effects of additives on the fermentation and aerobic stability of grass silages and total mixed rations. **Grass and Forage Science**, v. 71, p. 458-471, 2016.

SEPPÄLÄ, A.; HEIKKILÄ, T.; MÄKI, M.; MIETTINEN, H.; RINNE, M. Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations A. **Animal Feed Science and Technology**, v. 179, p. 54- 60, 2013.

STRATFORD, M.; STEELS, H.; NEBE-VON-CARON, G.; NOVODVORSKA, M.; HAYER, K.; ARCHER, D. B. Extreme resistance to weak-acid preservatives in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. **Int. Journal Food Microbiology**, v. 166, p. 126-134, 2013.

STRYSZEWSKA, K.; PYS, J. Effects of different silage additives on the microbial population and aerobic stability of maize silage. **Journal Animal Feed Science**, v. 15, p. 121-124, 2006.

TABACCO, E.; PIANO, S.; CAVALLARIN, L.; BERNARDES, T. F.; BORREANI, G. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of maize and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology.** v. 107, p. 1632-1642, 2009.

TYROLOVÁ Y.; BARTOŇ L.; LOUČKA R. Effects of biological and chemical additives on fermentation progress in maize silage. **Czech Journal Animal Science**, v. 62, p. 306-312, 2017.

WEINBERG, Z. G., G. SZAKACS, G. ASHBELL, AND Y. HEN. The effect of temperature on the ensiling process of corn and wheat. **Journal Applied Microbiology.** v. 90, p.561-566, 2001.

WEISS, K., KROSCHEWSKI, B.; AUERBACH, H. Effect of air exposure, temperature and additives on fermentation characteristics, yeasts count, aerobic stability and volatile organic compounds in corn silage. *J. Dairy Sci.* v. 99, p. 8053-8069, 2016.

WILKS, J. C.; KITKO, R. D.; CLEETON, S. H.; LEE, G. E.; UGWU, C. S.; JONES, B. D. 2009. Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. ***Applied and Environmental Microbiology*** 75, 981-990.

WOOLFORDM, K. Managing aerobic deterioration in silage. In *Silage Management* ed. McCullough, M. E. & Bolsen, K. K. pp. 42-77. Des Moines, Iowa: National Feed Ingredients Association. 1984.

YUAN, X.; GUO, G.; WEN, A.; DESTA, S. T.; WANG, J.; WANG, Y.; SHAO, T. The effect of different additives on the fermentation quality, *in vitro* digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. ***Animal Feed Science and Technology***, v. 207, p. 41-50, 2015.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Temperatura máxima, momento da temperatura máxima, estabilidade aeróbia, e temperatura e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

	Tratamentos ¹								Valor- <i>P</i>	Contrastes CTL vs.					
	CTL	PC1	PC1,5	PC2	FC1	FC1,5	FC2	EPM		Tratamento	PC1	PC1.5	PC2	FC1	FC1.5
Temperatura máxima, °C	46,7	47,1	46,7	46,6	46,6	46,6	46,3	0,31	0,74	0,97	0,88	0,91	0,37	0,37	0,28
Momento temp. máxima, min	1745	1715	1775	1800	1805	1820	1825	26,2	0,04	0,42	0,42	0,14	0,11	0,05	0,03
Estabilidade aeróbia, ² min	710	725	705	715	730	740	740	19,1	0,77	0,58	0,85	0,85	0,46	0,27	0,27
Temperatura 24 h, °C	45,4	43,4	43,1	43,2	43,5	41,9	44,9	1,03	0,11	0,25	0,14	0,22	0,23	0,05	0,70
Temperatura 48 h, °C	42,1	42,3	41,7	41,7	42,0	41,6	40,0	0,35	< 0,01	0,69	0,44	0,42	0,77	0,35	< 0,01
pH 24 h	5,52	5,46	5,47	5,76	5,73	5,41	5,48	0,093	0,07	0,67	0,70	0,08	0,12	0,41	0,78
pH 48 h	5,79	5,55	5,65	5,69	5,24	5,39	5,79	0,118	0,01	0,16	0,40	0,54	< 0,01	0,02	0,96

¹ CTL: Controle. PC1: Propionato de Cálcio 1 kg/ton. PC1,5 Propionato de Cálcio 1,5 kg/ton. PC2 Propionato de Cálcio 2 kg/ton. FC1 Fresh Cut 1 L/ton. FC1,5 Fresh Cut 1,5 L/ton. FC2 Fresh Cut 2 L/ton.

² Momento que a temperatura da dieta excedeu 2°C da temperatura ambiente mensurada na prateleira.

Tabela 2. Temperatura mensurada a cada 30 min por 48 h e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

	Tratamentos ¹							EPM	Valor-P			Contrastes CTL vs.					
	CTL	PC1	PC1,5	PC2	FC1	FC1,5	FC2		Tratamento	Tempo	Interação	PC1	PC1,5	PC2	FC1	FC1,5	FC2
Temp 0-48 h, °C	39,5	38,8	38,6	38,8	38,5	38,3	38,1	0,76	0,99	< 0,01	0,86	0,98	0,98	0,99	0,97	0,99	0,98
Temp 0-24 h, °C	34,8	33,0	33,0	33,2	32,6	32,4	32,2	0,82	0,38	< 0,01	0,33	0,12	0,14	0,18	0,06	0,44	0,03
Temp 24-48 h, °C	44,3	44,7	44,3	44,6	44,5	44,2	44,1	0,57	0,49	< 0,01	0,97	0,63	0,99	0,73	0,82	0,86	0,83
pH	5,66	5,51	5,56	5,72	5,48	5,40	5,64	0,112	0,09	0,53	0,02	0,20	0,40	0,56	0,14	0,03	0,85

¹ CTL: Controle. PC1: Propionato de Cálcio 1 kg/ton. PC1,5 Propionato de Cálcio 1,5 kg/ton. PC2 Propionato de Cálcio 2 kg/ton. FC1 Fresh Cut 1 L/ton. FC1,5 Fresh Cut 1,5 L/ton. FC2 Fresh Cut 2 L/ton.

Tabela 3. Bactérias aeróbias totais, bactérias formadoras de esporos, leveduras e fungos filamentosos após 24 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

	Tratamentos ¹							EPM	Valor- <i>P</i>		Contrastes CTL vs.				
	CTL	PC1	PC1,5	PC2	FC1	FC1,5	FC2		Tratamento	PC1	PC1,5	PC2	FC1	FC1,5	FC2
Bactérias aeróbias, log ufc/g	6,85	5,73	5,93	4,77	4,98	3,86	5,82	0,679	0,09	0,25	0,34	0,03	0,06	< 0,01	0,29
Bactérias formadoras de esporos, log ufc/g	5,74	5,71	5,15	4,11	4,24	3,27	5,05	0,577	0,04	0,97	0,47	0,05	0,07	< 0,01	0,40
Leveduras, log ufc/g	2,71	2,76	1,60	1,11	0,98	1,57	1,74	0,697	0,42	0,85	0,26	0,11	0,09	0,25	0,33
Fungos filamentosos, log ufc/g	3,35	2,37	1,85	1,59	1,37	1,07	1,73	0,552	0,11	0,06	0,06	0,03	0,01	< 0,01	0,05

¹ CTL: Controle. PC1: Propionato de Cálcio 1 kg/ton. PC1,5 Propionato de Cálcio 1,5 kg/ton. PC2 Propionato de Cálcio 2 kg/ton. FC1 Fresh Cut 1 L/ton. FC1,5 Fresh Cut 1,5 L/ton. FC2 Fresh Cut 2 L/ton.

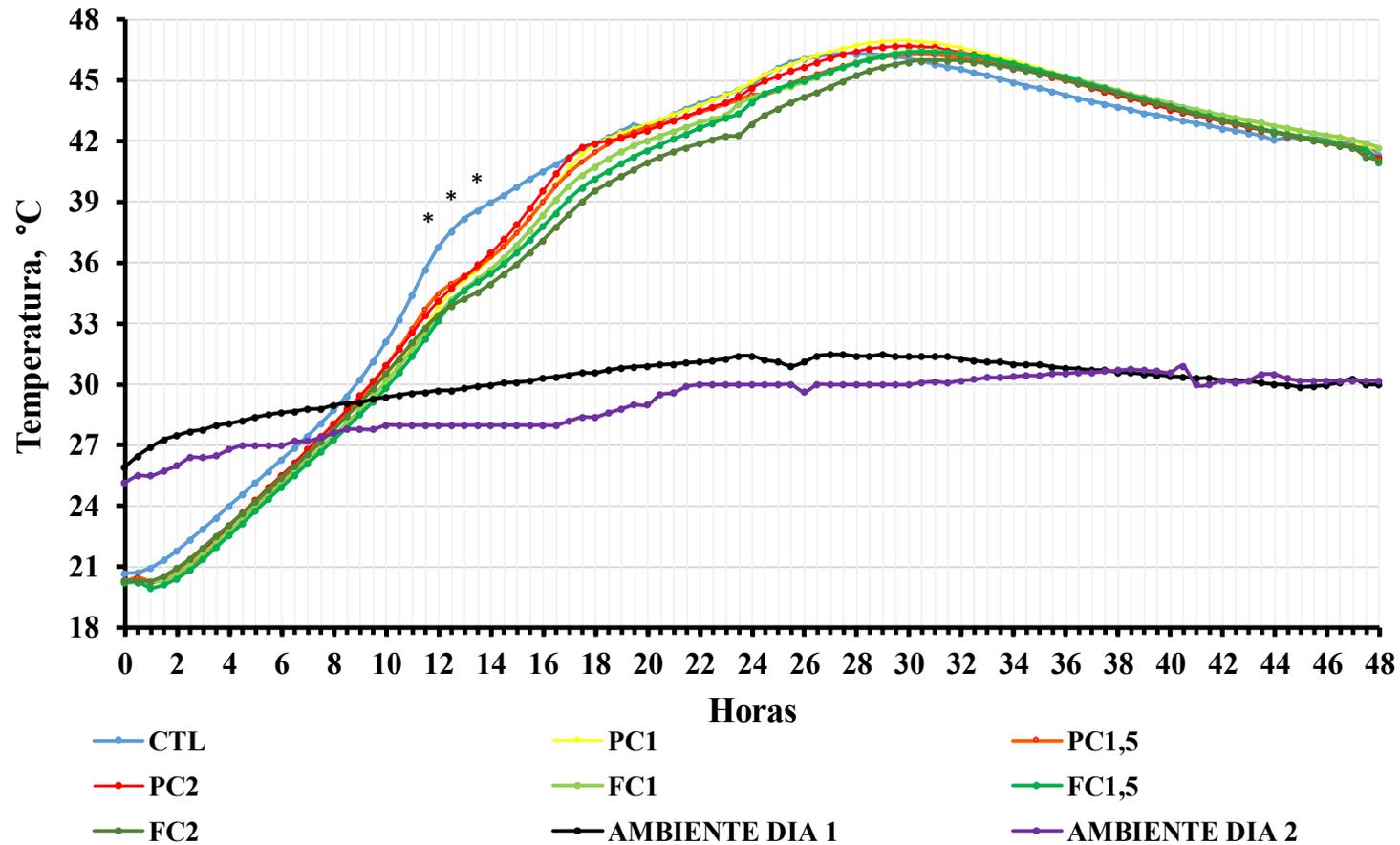


Figura 1. Temperatura do ambiente e das dietas tratadas com aditivos estabilizantes. Erro padrão das médias = 0,76 CTL: Controle. CTL: Controle. PC1: Propionato de Cálcio 1 kg/ton. PC1,5 Propionato de Cálcio 1,5 kg/ton. PC2 Propionato de Cálcio 2 kg/ton. FC1 Fresh Cut 1 L/ton. FC1,5 Fresh Cut 1,5 L/ton. FC2 Fresh Cut 2 L/ton. $P = 0,99$ para efeito fixo de tratamento; $P < 0,01$ para efeito fixo de hora e $P = 0,86$ para efeito fixo da interação entre tratamento e hora.

**ARTIGO 3 - ESTABILIDADE AERÓBIA DA DIETA DE VACAS LEITEIRAS
ADITIVADAS COM INIBIDORES DE CRESCIMENTO MICROBIANO**

(VERSÃO PRELIMINAR)

**ARTIGO PREPARADO DE ACORDO COM AS NORMAS PARA SUBMISSÃO DA
REVISTA BRASILEIRA DE ZOOTECNIA.**

J. P. Santos*, V. C. Souza*, E. F. Barbosa*, R. B. Silva‡, C. L. S. Ávila*, R. A. N. Pereira†,
D. N. Lobato¥, M. N. Pereira*¹

*Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia, Lavras, MG,37200-900, Brasil

‡Centro de Pesquisa Better Nature, Ijaci, MG, 37.218-000, Brasil.

†Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Unidade Regional Epamig Sul de Minas,
Lavras, MG, 37200-900, Brasil

¥ Alltech do Brasil, Araucária, Brasil.

RESUMO

A estabilidade aeróbia da dieta pode afetar o manejo alimentar e o CMS dos ruminantes. Avaliamos o efeito de três produtos (Alltech, Brasil) em duas dosagens de ácido propiônico na estabilidade aeróbia de uma TMR à base de silagem de milho (50,5% DM, pH 5,52). Os tratamentos foram: Controle (CTL), Mold-Zap 55 (55% de ácido propiônico, 12% de NH₄OH) a 0,5 (MZ55-B) e 1 L / tonelada (MZ55-A), Mold-Zap Aquativa (25% de ácido propiônico, NH₄OH a 3% e ácidos cítrico, sórbico, fórmico, láctico e ascórbico) a 1,1 (MZAQ-B) e 2,2 kg / ton (MZAQ-A) e Mold-Zap Aquativa Sorbato (ácido propiônico a 35%, NH₄OH a 3%), 15% de sorbato de potássio, e os ácidos cítrico e sórbico a 0,8 (MZSO-B) e 1,6 kg / tonelada (MZSO-A). Água (CTL) ou produtos diluídos em água (30 mL) foram misturados a 5 kg de TMR e colocados em 6 baldes / tratamento. Um balde com cada tratamento foi colocado em uma das 6 prateleiras em uma sala com ambiente controlado (29,1 ± 1,7 °C) por 48 h. As temperaturas da TMR e em cada prateleira foram mensuradas em intervalos de 30 min. A microbiologia foi avaliada às 24 h. O modelo estatístico continha os efeitos da prateleira e do tratamento. Os dados obtidos ao longo do tempo foram analisados como medidas repetidas. Os contrastes compararam o CTL com outros tratamentos. A temperatura máxima (46,4°C) e o momento máximo (1505 min) não diferiram ($P \geq 0,15$). A estabilidade aeróbia (momento da temperatura de TMR + 2°C do que o ambiente) foi aumentada por MZSO-A em relação ao CTL (830 vs. 710 min. $P < 0,01$) e tendências ($P \leq 0,09$) foram detectadas para MZAQ-A (775 min) e MZSO-B (770 min). A temperatura de 0 a 24 h foi reduzida ($P \leq 0,05$) por MZ55-B (32,8°C), MZAQ-A (32,1°C), MZSO-B (32,4°C) e MZSO-A (31,5°C) em relação ao CTL (34,8°C) e tendências ($P = 0,06$) foram observadas para MZ55-A (32,8°C) e MZAQ-B (32,9°C). A temperatura de 24 a 48 h (44,0°C) não diferiu ($P \geq 0,36$). MZAQ-A e MZSO-B reduziram ($P \leq 0,03$) bactérias formadoras de esporos (log ufc / g). As bactérias aeróbicas não diferiram ($P \geq 0,34$). A levedura foi reduzida ($P \leq 0,01$) por MZ55-B, MZAQ-B e MZSO-A e tendeu a ser reduzida ($P = 0,06$) por MZ55-A, MZAQ-A e MZSO-B. Os fungos filamentosos foram reduzidos ($P < 0,01$) em todos os tratamentos. Os inibidores de crescimento microbiano reduziram a temperatura da TMR de 0 a 24 h, levedura e fungos filamentosos. O produto MZSO foi o mais eficaz.

Palavras-chave: Estabilidade aeróbia. Ácido propiônico. Sorbato. Estabilidade da ração mista total.

1 INTRODUÇÃO

A estabilidade aeróbia de silagens e dos ingredientes utilizados na confecção de ração mista total (TMR, total mixed ration) está diretamente correlacionada com a estabilidade da TMR no cocho. Com o desenvolvimento dos microrganismos ocorre a produção de calor e consequentemente aquecimento da TMR no cocho, podendo esse processo ocorrer dentro de 12 h a partir da homogeneização dos ingredientes (Kung, 2005), gerando consequências negativas como a perda de matéria seca (MS) e de nutrientes, redução no consumo de matéria seca (CMS) pelos animais provocando queda na produção de leite (Kung, 2005). Além disso, pode ocorrer a proliferação de microrganismos potencialmente patogênicos ou indesejáveis afetando negativamente a qualidade e segurança alimentar do leite bem como a saúde e o desempenho animal (Driehuis e Oude- Elferink 2000).

As silagens são misturadas aos alimentos concentrados imediatamente antes da alimentação dos animais, expondo a silagem em contato com o oxigênio, além de potencialmente fornecer mais substrato aos microrganismos já presentes na silagem, o que pode comprometer a estabilidade aeróbia da TMR no cocho. Uma alternativa para amenizar o impacto do aquecimento das dietas no cocho seria o fornecimento desta aos animais em intervalos mais curtos durante o dia com remoção das possíveis sobras do fornecimento anterior. No entanto, essas operações geram custos, gasto de tempo e mão de obra, o que se torna inviável por questões práticas ou por refletir negativamente na eficiência de produção do sistema.

A estabilidade aeróbia é designada como o tempo em que a silagem ou a TMR permanece estável, ou seja, sem aquecimento devido à atividade microbiana. Silagens bem confeccionadas e armazenadas e ainda ingredientes de boa qualidade devem ser preconizados a fim de restringir o início da extensão da deterioração aeróbia. Outra estratégia é a utilização de aditivos que visam aumentar a estabilidade aeróbia desses alimentos. Aditivos aplicados na ensilagem ou na fase de fornecimento dos alimentos aos animais deve ser considerado apenas como um meio de controlar as perdas, uma vez que as práticas de manejo na confecção e utilização das silagens devem ser realizadas corretamente pois são relevantes para limitar a deterioração aeróbia.

A utilização de aditivos químicos com objetivo de aumentar estabilidade aeróbia tem sido bastante relatada em silagens de gramíneas (Stryszewska e Pys 2006; Tyrolová, Barton e Loucka 2017; Kung et al., 2018; Bernardes et al., 2014), silagens de grãos cereais úmidos ou reconstituídos (Adesogan et al., 2003; Kung et al., 2004; Da Silva et al., 2015; Moriel et al.,

2016; Santos et al., 2019) e também em silagens de dieta total (Chen et al., 2015, 2016; Yuan et al., 2015). No entanto, poucos estudos têm sido desenvolvidos com intuito de avaliar a aplicação desses aditivos no momento da homogeneização dos ingredientes sobre a estabilidade aeróbia da TMR no cocho (Kung et al., 1998; Kung, 2005, Seppala et al., 2013; 2016). Aditivos químicos como os ácidos orgânicos têm o potencial de melhorar a estabilidade aeróbia dos alimentos e exercem efeitos antimicrobianos de formas distintas. Primeiro devido à redução do pH do meio externo e, segundo, devido à ação da sua forma não dissociada que consegue atravessar a membrana microbiana por transporte passivo, por ser solúvel em lipídeos, alterando o pH citoplasmático, o metabolismo e a pressão osmótica da célula microbiana, o que inibe seu desenvolvimento (Russel, 1992).

A hipótese deste trabalho é que a adição dos aditivos químicos melhora a estabilidade aeróbia e reduz o aquecimento das dietas no cocho permitindo o fornecimento destas uma vez ao dia. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da associação entre substâncias químicas como o ácido propiônico, hidróxido de amônia, ácido cítrico, ácido sórbico, carbonato de cálcio, ácido fórmico, ácido láctico e ácido ascórbico sob a estabilidade aeróbia de TMR baseadas em silagem de milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Dieta, tratamentos e unidades experimentais

A dieta utilizada (TMR) foi homogeneizada em misturador estacionário vertical (Unimix 1200. Casale Equipamentos Ltda, São Carlos, SP), sendo composta pelos seguintes ingredientes (% da MS): 35,5% de silagem de milho (40% de MS), 13,3% de silagem de sorgo (30% de MS), 2,7% de feno de aveia (87,6% de MS), 8,2% de caroço de algodão, 13,1% de farelo de soja, 14,9% de milho reidratado ensilado (61,0% de MS), 5,9% de resíduo de destilaria com solutos (FlexyPro Cargill), 3,2% de polpa cítrica e 3,1% de premix com minerais, vitaminas e aditivos (Bicarbonato de sódio, óxido de magnésio, levedura morta, adsorvente de micotoxinas, beta caroteno). O teor de MS da dieta foi 50,5% da matéria natural. A composição da dieta em nutrientes foi (% da MS): 16,2 de proteína bruta, 35,0% de fibra em detergente neutro, 4,8% de extrato etéreo, 37,3% de carboidratos não-fibrosos, 24,7% de amido.

Os sete tratamentos foram: Controle (CTL. Água destilada), o produto líquido MOLDZAP 55 [Ácido propiônico (55%), hidróxido de amônia (12%), água] na dose baixa (MZ55-B, 0,5 L/ton) e na dose alta (MZ55-A 1,0 L/ton) e os produtos sólidos MOLDZAP AQUATIVA PÓ [Ácido propiônico (25%), hidróxido de amônia (3%), ácido cítrico, ácido sórbico, dióxido de silício, carbonato de cálcio, propileno glicol, ácido fórmico, ácido láctico, ácido ascórbico] na dose baixa (MZAQ-B. 1,1 kg/ton) e na dose alta (MZAQ-A. 2,2 kg/ton) e MOLDZAP AQUATIVA SORBATO [Ácido propiônico (35%), sorbato de potássio (15%), hidróxido de amônia (3%), ácido cítrico, ácido sórbico, dióxido de silício] na dose baixa (MZSOB. 0,8 kg/ton) e na dose alta (MZSO-A. 1,6 kg/ton). O produto líquido foi diluído em 30 mL de água destilada e foi aspergido sobre 5 kg da dieta com um pulverizador manual. Os produtos sólidos foram homogeneizados a 5 kg da dieta que foi posteriormente pulverizada com 30 mL de água destilada.

Os tratamentos foram avaliados em duas rodadas experimentais não consecutivas conduzidas em sala sem ventilação com temperatura mantida ao redor de 30°C por aquecedor elétrico. As unidades experimentais foram baldes de 30 L (35 cm de altura e 29 cm de diâmetro) contendo 5 kg da dieta com os tratamentos. Foram avaliados 3 baldes por tratamento em cada rodada experimental, totalizando 21 unidades experimentais por rodada (N = 6 baldes/tratamento). Uma unidade experimental de cada tratamento foi colocada em uma de três prateleiras de estante (7 baldes por prateleira) no centro da sala ficando a 20 cm, 80 cm ou 150 cm do piso. Prateleira/rodada experimental (1 a 6) foi considerado como bloco no modelo de

análise estatística visando ajustar para a variação da temperatura ambiente dentro da sala climatizada.

2.2 Temperatura e pH da dieta

Para o monitoramento da temperatura das dietas e do ambiente de cada prateleira a intervalos de 30 minutos por 48 horas foram utilizados dataloggers (Modelo MX-ST-S-8-L iMINI. Cryopak Verification Technologies, Buchanan, EUA). Um datalogger foi inserido no centro da dieta em cada balde e outro foi deixado sobre cada uma das três prateleiras. A estabilidade aeróbia da dieta foi definida como o momento que a temperatura da dieta excedeu 2°C da temperatura ambiente mensurada na prateleira (Moran, et al., 1996). A temperatura do ambiente nas duas rodadas experimentais foi $29,1 \pm 1,7^\circ\text{C}$ (Média \pm DP de 6 termômetros nas prateleiras a cada 30 minutos por 48 h).

Nos tempos 24 h e 48 h do início do ensaio, uma amostra da dieta foi coletada no centro da massa para mensuração do pH. Amostras de 25 g da dieta foram misturadas a 225 mL de água destilada e agitadas durante 4 min a 200 rpm em agitador orbital (Modelo 430. Nova Ética, São Paulo, SP). A partir do extrato obtido, o pH foi determinado (Phmetro Digimed DM 20. Digidrom Analítica, São Paulo, SP).

2.3 Microbiologia

Amostras de 25 g da dieta foram obtidas no tempo 24 h, inseridas assepticamente em 225 mL de água peptonada estéril (0,1%) e agitadas durante 20 minutos a 200 rpm em agitador orbital (Modelo 430. Nova Ética, São Paulo, SP). A partir do extrato obtido, foram preparadas diluições decimais de 10^{-1} a 10^{-5} . As populações de bactérias aeróbias totais, fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias formadoras de esporos foram determinadas por plaqueamento em superfície, tomando-se 0,1 mL de cada diluição, em duplicata. A contagem de bactérias aeróbias totais foi realizada com o meio Ágar Nutriente (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia). As placas foram incubadas à 37 °C e a contagem foi realizada após 48 h. A contagem de fungos filamentosos e leveduras foi pelo meio Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC) em incubação a 28 °C. A contagem de leveduras foi realizada após 72 h e para fungos filamentosos após 120 horas. As bactérias aeróbias formadoras de esporos foram enumeradas em uma amostra do extrato aquoso mantida a 80°C por 10 min e diluições decimais adicionais foram plaqueadas em meio Agar Nutriente (HiMedia Laboratories, Mumbai, Índia) e incubadas a 37°C por 72 h.

2.4 Análise estatística

Os dados de temperatura e pH da dieta obtidos ao longo do tempo foram analisados com o PROC MIXED do SAS (versão 9.3, 2011, SAS Institute Inc., Cary, NC). O modelo estatístico continha os efeitos fixos de bloco (1 a 6), tratamento (CTL, MZ55-B, MZ55-A, MZAQ-B, MZAQ-A, MZSO-B e MZSO-A) e tempo (min) e a interação entre tratamento e tempo. Balde aninhado em tratamento foi definido como aleatório. A melhor estrutura de covariância foi definida pelo critério Bayesiano de Schwarz entre autoregressiva de primeira ordem e simetria composta. Os graus de liberdade foram calculados usando a opção Kenward-Roger. Modelo similar foi adotado para variáveis mensuradas uma vez (Temperatura máxima, momento da temperatura máxima, estabilidade aeróbia, temperatura e pH nos tempos 24 h e 48 h e contagens microbiológicas) removendo o efeito de tempo e sua interação com tratamento do modelo anterior. A significância foi declarada a $P \leq 0,05$ e as tendências a $P \leq 0,15$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Silagens com alta concentração de amido ou açúcares são mais propensas à deterioração aeróbia, conseqüentemente TMR's confeccionadas com essas silagens também serão mais propícias à deterioração (Kung, et al., 2005). A TMR utilizada em nosso estudo continha aproximadamente 50% de silagem de milho em sua composição o que a predispõe a uma maior probabilidade de deterioração e menor estabilidade aeróbia. Além disso a temperatura em que essas TMR's foram armazenadas estão acima das temperaturas utilizadas em alguns trabalhos para mensurar o potencial efetivo dos aditivos químicos sob a estabilidade aeróbia de silagens e TMR's (Seppala et al., 2013; Da silva et al.; 2015), mostrando que o desafio em nosso estudo foi maior e o intuito era assemelhar-se às temperaturas de dias mais quentes na época do verão.

A estabilidade aeróbia é expressa como o tempo em que a silagem ou a TMR permanece estável após exposição ao ar, ou seja, sem que ocorra desenvolvimento de microrganismos e aquecimento da massa (Kung, 2005). A nossa hipótese era de que o aditivo fosse eficaz ao ponto de aumentar a estabilidade aeróbia da TMR para que esta fosse fornecida uma vez ao dia sem que ocorresse aquecimento, perdas nutricionais e queda do desempenho animal. Os aditivos, como um grupo, tenderam ($P = 0,07$ para o contraste CTL vs. Aditivo) a aumentar a estabilidade aeróbia da dieta (TABELA 1). O tratamento MZSO-A foi o mais efetivo ($P < 0,01$) em aumentar a estabilidade aeróbia da TMR relativamente ao CTL. Os aditivos, como um grupo, reduziram ($P = 0,05$ para o contraste CTL vs. Aditivo) a temperatura da silagem no tempo 24 h (TABELA 1). Os tratamentos MZSQ-A e MZSO-A foram os mais efetivos em reduzir a temperatura em 24 h relativamente ao CTL ($P \leq 0,01$) e o efeito dos aditivos sobre a temperatura em 48 h foi menos pronunciado. As doses altas (MZ55-A, MZSO-A e MZSQ-A) tenderam a ser mais efetivas no controle da estabilidade aeróbia e da temperatura da dieta em 24 h e 48 h que as doses baixas (MZ55-B, MZSO-B, MZSQ-B) ($P \leq 0,13$ para o contraste Baixo vs. Alto) (TABELA 1).

Os tratamentos MZ55-B, MZSO-B e MZSO-A reduziram ($P \leq 0,03$) o pH da dieta em 48 h relativamente ao CTL (TABELA 1). Quando a temperatura das dietas foi analisada ao longo do tempo, os aditivos tenderam ($P = 0,08$) a reduzir a temperatura nas primeiras 24 h e não houve efeito detectável ($P = 0,86$) entre 24 e 48 h (TABELA 2). Todos os aditivos e dosagens reduziram a temperatura da dieta nas primeiras 24 h. O tratamento MZSO-A foi o mais efetivo em induzir queda na temperatura nas primeiras 24 h relativamente ao CTL ($P < 0,01$).

A relativa contribuição de cada ingrediente para melhorar a estabilidade aeróbia não pôde ser verificada em nosso estudo, mas sugere-se ao maior potencial do ácido propiônico e da sua associação com o ácido sórbico e seu sal sorbato de potássio na composição do MZSO. O ácido propiônico ou o seu sal foi mais potente em inibir o crescimento de microrganismos deterioradores em relação aos outros ácidos e geralmente constitui a maior porcentagem dos ingredientes ativos usados em produtos comerciais hoje (Moon et al., 1983; Kung et al., 1998; Mills e Kung 2002). Em adição, o sorbato e/ou ácido sórbico, em mesma base equimolar, tem se mostrado mais efetivo em inibir tanto bactérias quanto fungos e leveduras em relação a outros ácidos como por exemplo, ácido benzoico, ácido acético, ácido fórmico e ácido cáprico (Kleinschmit et al. 2005; Teller et al., 2012; Auerbach e Nadeau, 2013; Bernardes et al., 2014). Além do mais, foi demonstrado por Woolford (1984) que, em uma mesma base equimolar, os sais apresentam-se mais ativos contra os microrganismos indesejáveis que os ácidos livres e maiores benefícios são encontrados com a utilização conjunta de sais e ácidos livres.

Os tratamentos MZAQ-A e MZSO-A foram os mais efetivos em reduzir a temperatura em 24 h relativamente ao CTL. O efeito dos aditivos sobre a temperatura em 48 h foi menos expressivo. A aplicação de um produto a base de propionato de amônio, ácido propiônico, propileno glicol, sorbato de potássio, benzoato de sódio reduziu, após 24 horas, a temperatura em 13 °C das sobras de uma TMR que possuía 47% de silagem de milho e aumentou em 100 h a estabilidade em relação a TMR não tratada (Kung et al., 1998). Os ácidos orgânicos podem inibir o desenvolvimento de microrganismos pela redução do pH do meio externo ou por ação da sua forma não dissociada que consegue atravessar a membrana microbiana por transporte passivo, devido a sua solubilidade em lipídeos, alterando o pH citoplasmático e consequentemente afetando o metabolismo e a pressão osmótica da célula microbiana o que inibe seu desenvolvimento (Russel, 1992). A contagem de bactérias aeróbias não foi afetada pelos tratamentos.

Os tratamentos MZAQ-A e MZSO-B reduziram a contagem de bactérias formadoras de esporos relativamente ao CTL. Já o tratamento MZSO-A não apresentou diferenças em relação ao controle para a contagem desses microrganismos, o que não era esperado sugerindo ativação de mecanismos adaptativos ao estresse ácido. Após exposição a condições ácidas extremas, muitas bactérias ativam enzimas que contribuem para o pH homeostase (Pandey et al., 2016). As células podem bombear prótons para fora da célula, impedir que os prótons vazem e neutralizar a acidificação do citoplasma produzindo compostos alcalinos (Mols et al., 2011). Genes de enzimas transportadoras de prótons foram altamente induzidos após exposição letal a ácidos (Cotter e Hill, 2003; Foster, 2004). Outro mecanismo bem conhecido da produção de

álcalis é a hidrólise da ureia em amônia e CO₂ pela enzima urease e essa está envolvida na resistência a ácidos de várias bactérias (Mobley et al., 1995; Wray et al., 1997).

A Figura 1 relata a temperatura da dieta e do ambiente ao longo de 48 h, enfatizando o efeito redutor da temperatura da dieta induzido pelos aditivos nas primeiras 24 h. Maior queda na temperatura da dieta ocorreu entre os tempos 11,5 h e 19,5 h ($P \leq 0,05$ para o efeito de tratamento. Opção slice do SAS). O tratamento MZSO-A induziu temperatura da dieta consistentemente inferior aos outros tratamentos. Os tratamentos não tiveram efeito ($P = 0,44$) sobre a contagem de bactérias aeróbias da dieta (TABELA 3). Os tratamentos MZ55-B, MZAQ-A e MZSO-B reduziram ($P \leq 0,03$) a contagem de bactérias formadoras de esporos relativamente ao CTL (TABELA 3). Todos os tratamentos reduziram leveduras e fungos filamentosos na dieta relativamente ao CTL (TABELA 3). O pH não foi um bom indicador da capacidade dos tratamentos de afetar a temperatura e a estabilidade aeróbia das dietas.

Os aditivos foram capazes de reduzir a contagem de leveduras e fungos filamentosos relativamente ao CTL ($P < 0,01$). Efeitos antifúngicos de ácidos orgânicos também são atribuídos depleção de ATP necessária para livrar a célula de excesso de hidrogênio do ácido dissociado (Koczoń, 2009). O ácido sórbico também pode inibir leveduras alterando processos metabólicos em suas membranas como por exemplo a síntese de lipídeos constituintes de membrana (Stratford e Anslow, 1998).

A formulação e a taxa de aplicação do produto devem ser avaliadas para que seja efetiva em condições mais extremas como temperatura mais altas ou ingredientes que são mais propensos à deterioração aeróbia.

4 CONCLUSÃO

Os estabilizantes e as doses avaliadas foram efetivas em reduzir a temperatura da dieta nas primeiras 24 h quando a temperatura ambiente foi continuamente mantida ao redor de 29 °C. O tratamento MZSO-A aparentemente foi o mais efetivo, sugerindo que a combinação de ácido propiônico com sorbato de potássio foi a mais promissora para induzir estabilidade na temperatura da dieta e propiciar redução na frequência diária de alimentações em rebanhos. A redução na necessidade de mão de obra para alimentação do rebanho, pela possibilidade de concentrar a alimentação em um período do dia, pode compensar o investimento nos estabilizantes.

A composição dos produtos baseados em ácidos orgânicos e as doses de aplicação devem ser avaliadas levando em consideração a intensidade de deterioração dos componentes da dieta bem como a temperatura do ambiente. E experimentos *in vivo* com vacas em lactação também são necessários para avaliar o efeito dos estabilizantes sobre o consumo de matéria seca e o desempenho leiteiro, principalmente durante períodos quentes do ano.

REFERÊNCIAS

- ADESOGAN, A. T.; SALAWU, M. B.; ROSS, A. B.; DAVIES, D. R.; BROOKS, A. E. Effects of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* and *Leuconostoc mesenteroides* or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability and nutritive value of crimped wheat grains. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1789-1796, 2003.
- AUERBACH, H.; NADEAU, E. Effects of chemical additives on whole crop maize silage traits. In Proc. 22 Int. Grassl. Congr., Sydney, New South Wales, Australia. D. L. Michalk, G. D. Millar, W. B. Badgery, and K. M. Broadfoot, ed. New South Wales Department of Primary Industry, Orange, New South Wales Australia. Pages 736-737 2013.
- BERNARDES, T. F.; DE OLIVIERA, I. L.; LARA M. A. S.; CASAGRANDE, D. R.; AVILA C. L. S.; PEREIRA, O. G. Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. **Grass Forage Science**, v. 70, p. 491-498, 2014.
- CHEN, L.; GUO, G; YUAN, X. J.; ZHANG, J.; LI, J. F.; SHAO, T. Effects of applying molasses, lactic acid bacteria and propionic acid on fermentation quality, aerobic stability and *in vitro* gas production of total mixed ration silage prepared with oat-common vetch intercrop on the Tibetan Plateau. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, p. 1678-1685, 2016.
- CHEN, L.; YUAN, X.; LI, J.; WANG, S.; DONG, Z.; SHAO, T. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and *in vitro* gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 15(7), p. 1592-1600, 2015.
- COTTER, P. D.; HILL, C. Surviving the acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, p. 429-453, 2003.
- DA SILVA, T. C.; SMITH, M. L.; BARNARD, A. M.; KUNG JR, L. The effect of a chemical additive on the fermentation and aerobic stability of high moisture corn. **Journal of Dairy Science**, vol. 98, 2015, p. 8904-8912. 2015.
- DRIEHUIS, F., OUDE ELFERINK, S. J. W. H. The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. **Vet. Quart.**, v. 22, p. 212-216, 2000.
- FOSTER, J. W. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p. 898-907, 2004.
- KOCZOŃ, P. Growth inhibition mode of action of selected benzoic acid derivatives against the yeast *Pichia anomala*. **Journal of Food Protection**. v. 72, p. 791-800, 2009.
- KUNG JR., L., Aerobic stability of silages. In: Proceedings of the Conference on Silage for Dairy Farms, Arrisburg
Chttp://ag.udel.edu/anfs/faculty/kung/documents/05AerobicStability.pdf (cited 28.10.19). 2005.

- KUNG, L. JR.; MEYERS, C. L.; NEYLON, J. M.; TAYLOR, C. C., LAZARTIC, J. A.; MILLS, J. A.; WHITER, A. G. The effects of buffered propionic acid-based additives alone or combined with microbial inoculation on the fermentation of high moisture corn and wholecrop barley. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1310-1316, 2004.
- KUNG, L. JR.; SMITH, M. L.; SILVA, E. B.; WINDLE, M. C.; SILVA T. C.; POLUKIS, S. A. An evaluation of the effectiveness of a chemical additive based on sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 101, p. 1-12, 2018.
- KUNG, L.; SHEPERD, A. C.; SMAGALA, A. M.; ENDRES, K. M.; BESSETT, C. A.; RANJIT, N. K.; GLANCEY, J. L. The effect of preservatives based on propionic acid on the fermentation and aerobic stability of corn silage and a total mixed ration. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1322-1330, 1998.
- MILLS, J. A.; L. KUNG, Jr. The effect of delayed ensiling and application of a propionic acid based additive on the fermentation of barley silage. *Journal of Dairy Science*. v. 85, p. 1969-1975, 2002.
- MOBLEY, H. L.; ISLAND, M. D.; HAUSINGER, R. P. Molecular biology of microbial ureases. **Microbiol Review** v. 59, p. 451-480, 1995.
- MOLS, M. A. T. *Bacillus cereus* responses to acid stress. *Environ Microbiol* v. 13, p. 2835-2841, 2011.
- MOON, N. J. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. **Journal Applied of Bacteriology**. v. 55, p. 454-460, 1983.
- MORAN, J. P.; WE INBERG, Z. G.; ASHBELL, G.; HEN, Y.; OWEN, T. R. A comparison of two methods for the evaluation of the aerobic stability of whole crop wheat silage. In: Jones D.I.H., Jones R., Dewhurst R. and Merry R.J. (eds) **Proceedings** of the XI International Silage Conference, Aberystwyth, p. 162-163, 1996.
- MORIEL, P.; PICCOLO, M. B.; ARTIOLI, L. F. A.; SANTOS, G. S.; POORE, M. H.; FERRARETTO, L. F.; Method of propionic acid-based preservative addition and its effects on nutritive value and fermentation characteristics of wet brewers grains ensiled in the summertime. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, p. 591-597, 2016.
- RUSSEL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*. V. 73, p. 363-370, 1992.
- SANTOS, W. P.; SALVATI, G. G. S.; SILVEIRA, J. M.; SALVO, P. A. R.; ARTHUR, B. A. V.; GRITTI, V. C.; OLIVEIRA, K. S.; FERRAZ, M. V. JR.; DANIEL, J. L. P.; NUSSIO, L. G. The effect of length of storage and sodium benzoate on the nutritive value of reconstituted sorghum grain silages for dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 102 In press, 2019.
- SAS Institute. 2011. SAS/STAT User's Guide. SAS Inst. Inc., version 9.3 ed, Cary, NC.

SEPPÄLÄÄ, A.; HEIKKILÄÄ, T.; MÄKIA, M.; MIETTINENB, H.; RINNEA, M. Controlling aerobic stability of grass silage-based total mixed rations A. **Animal Feed Science and Technology**, v. 179, p. 54- 60, 2013.

STRATFORD, M.; ANSLOW, P. A. Evidence that sorbic acid does not inhibit yeast as a classic 'weak acid preservative'. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p.203-206, 1998.

STRYSZEWSKA, K.; PYS, J. Effects of different silage additives on the microbial population and aerobic stability of maize silage. **Journal Animal Feed Science**, v. 15, p. 121-124, 2006.

TELLER, R. S.; R. J. SCHMIDT; L. W. WHITLOW; L. KUNG Jr. Effect of physical damage to ears of corn before harvest and treatment with various additives on the concentration of mycotoxins, silage fermentation, and aerobic stability of corn silage. *Journal of Dairy Science*. v. 95, p. 1428-1436, 2012.

TYROLOVÁ Y.; BARTOŇ L.; LOUČKA R. Effects of biological and chemical additives on fermentation progress in maize silage. **Czech Journal Animal Science**, v. 62, p. 306-312, 2017.

WOOLFORD, M. K. Managing aerobic deterioration in silage. In **Silage Management** ed. McCullough, M. E. & Bolsen, K. K. Des Moines, Iowa: National Feed Ingredients Association. p. 42-77, 1984.

WRAY, L.V.; JR, FERSON, A. E.; FISHER, S. H. Expression of the *Bacillus subtilis ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and Spo0H. **Journal of Bacteriology**. v. 179, p. 5494-5501, 1997.

YUAN, X.; GUO, G.; WEN, A.; DESTA, S. T.; WANG, J.; WANG, Y.; SHAO, T. The effect of different additives on the fermentation quality, *in vitro* digestibility and aerobic stability of a total mixed ration silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 207, p. 41-50, 2015.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Temperatura máxima, momento da temperatura máxima, estabilidade aeróbia, e temperatura e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

	Tratamentos ¹							EPM	Valor- <i>P</i> Tratamento
	CTL	MZ55-B	MZ55-A	MZAQ-B	MZAQ-A	MZSO-B	MZSO-A		
Temperatura máxima, °C	46,7	46,7	47,2	46,6	46,0	46,0	45,7	0,725	0,76
Momento da temperatura máxima, min	1760	1750	1750	1700	1805	1770	1800	28,9	0,21
Estabilidade aeróbia, ² min	710	730	725	735	775	770	830	24,8	0,03
Temperatura 24 h, °C	45,2	44,5	44,4	44,2	42,3	43,3	42,0	0,76	0,05
Temperatura 48 h, °C	41,2	42,5	41,6	41,2	40,8	40,9	40,0	0,45	0,04
pH 24 h	5,52	5,78	5,68	5,66	5,51	5,48	5,39	0,096	0,09
pH 48 h	5,68	5,35	5,49	5,52	5,61	5,27	5,31	0,106	0,08

¹ CTL: Controle. MZ55-B: Moldzap 55 Baixo. MZ55-A: Moldzap 55 Alto. MZAQ-B: Moldzap Aquativa Pó Baixo. MZAQ-A: Moldzap Aquativa Pó Alto. MZSO-B: Moldzap Aquativa Sorbato Baixo. MZSO-A: Moldzap Aquativa Sorbato Alto.

² Momento que a temperatura da dieta excedeu 2°C da temperatura ambiente mensurada na prateleira.

Tabela 2. Temperatura mensurada a cada 30 min por 48 h e pH nos tempos 24 h e 48 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

	Tratamentos ¹							EPM	Valor-P		
	CTL	MZ55-B	MZ55-A	MZAQ-B	MZAQ-A	MZSO-B	MZSO-A		Tratamento	Tempo	Interação
Temperatura 0-48 h, °C	39,1	38,5	38,6	38,3	37,8	38,0	37,2	0,736	0,67	< 0,01	0,99
Temperatura 0-24 h, °C	34,8	32,8	32,8	32,9	32,1	32,4	31,5	0,721	0,08	< 0,01	0,99
Temperatura 24-48 h, °C	44,2	44,4	44,8	43,8	43,6	43,7	43,2	0,839	0,86	< 0,01	0,99
pH	5,60	5,57	5,59	5,59	5,55	5,39	5,35	0,084	0,24	0,14	0,37

¹ CTL: Controle. MZ55-B: Moldzap 55 Baixo. MZ55-A: Moldzap 55 Alto. MZAQ-B: Moldzap Aquativa Pó Baixo. MZAQ-A: Moldzap Aquativa Pó Alto. MZSO-B: Moldzap Aquativa Sorbato Baixo. MZSO-A: Moldzap Aquativa Sorbato Alto.

Tabela 3. Bactérias aeróbias totais, bactérias formadoras de esporos, leveduras e fungos filamentosos após 24 h das dietas tratadas com aditivos estabilizantes.

	Tratamentos ¹							EPM	Valor- <i>P</i>
	CTL	MZ55-B	MZ55-A	MZAQ-B	MZAQ-A	MZSO-B	MZSO-A		Tratamento
Bactérias aeróbias, log ufc/g	6,85	6,91	6,71	6,17	6,94	6,46	6,53	0,281	0,44
Bactérias formadoras de esporos, log ufc/g	5,74	5,21	5,46	5,80	5,27	5,14	5,54	0,146	0,02
Leveduras, log ufc/g	2,71	0,54	1,27	0,56	1,26	1,25	0,69	0,529	0,09
Fungos filamentosos, log ufc/g	3,35	1,61	1,62	1,63	1,66	1,63	1,55	0,254	< 0,01

¹ CTL: Controle. MZ55-B: Moldzap 55 Baixo. MZ55-A: Moldzap 55 Alto. MZAQ-B: Moldzap Aquativa Pó Baixo. MZAQ-A: Moldzap Aquativa Pó Alto. MZSO-B: Moldzap Aquativa Sorbato Baixo. MZSO-A: Moldzap Aquativa Sorbato Alto.

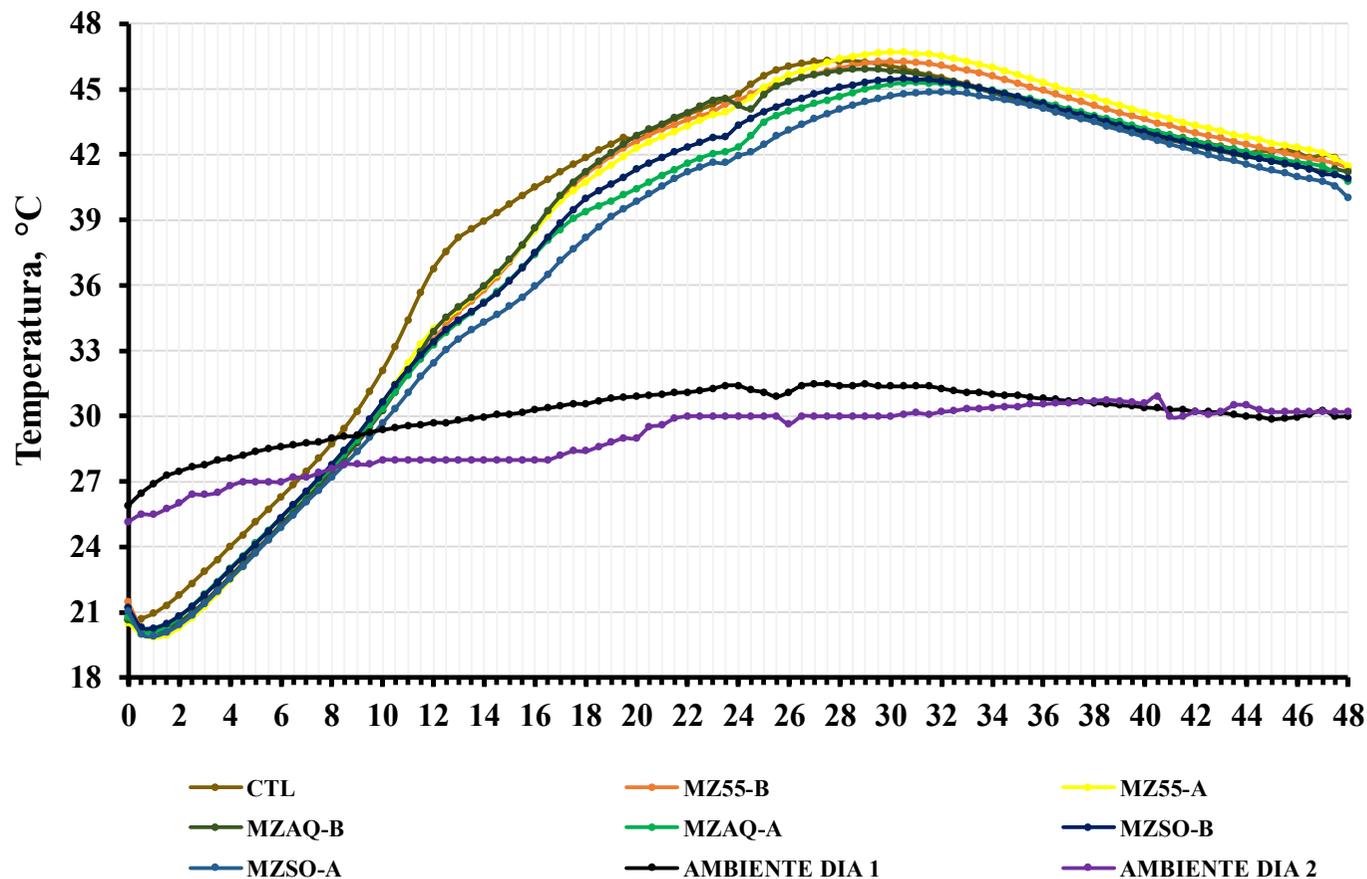


Figura 1. Temperatura do ambiente e das dietas tratadas com aditivos estabilizantes. Erro padrão das médias = 0,83. CTL: Controle. MZ55-B: Moldzap 55 Baixo. MZ55-A: Moldzap 55 Alto. MZAQ-B: Moldzap Aquativa Pó Baixo. MZAQ-A: Moldzap Aquativa Pó Alto. MZSO-B: Moldzap Aquativa Sorbato Baixo. MZSO-A: Moldzap Aquativa Sorbato Alto. $P = 0,67$ para efeito fixo de tratamento; $P < 0,01$ para efeito fixo de hora e $P = 0,99$ para efeito fixo da interação entre tratamento e hora.