



Universidade Federal do Amazonas
Faculdade de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal



**EFEITO DE ADIÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE E PEPSINA AO LONGO DO
TEMPO DE ENSILAGEM DO MILHO GRÃO MOÍDO E REIDRATADO**

PAULO HENRIQUE CARLONI FLEURY CURADO

MANAUS – AMAZONAS

Outubro, 2020

PAULO HENRIQUE CARLONI FLEURY CURADO

**EFEITO DE ADIÇÃO DE AMILOGLUCOSIDASE E PEPSINA AO LONGO DO
TEMPO DE ENSILAGEM DO MILHO GRÃO MOÍDO E REIDRATADO**

Orientador: Ronaldo Francisco Lima, DSc.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – PPGCAN da Universidade Federal do Amazonas – UFAM como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

MANAUS – AMAZONAS

Outubro, 2020

Autoriza-se a reprodução do todo ou de partes desse trabalho desde que a fonte seja citada.

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C975e Curado, Paulo Henrique Carloni Fleury
Efeito de adição de amiloglucosidase e pepsina ao longo do tempo de ensilagem do milho grão moído e reidratado / Paulo Henrique Carloni Fleury Curado . 2020
39 f.: 31 cm.

Orientador: Ronaldo Francisco de Lima
Coorientador: Marcos Vinícius de Castro Ferraz Junior
Coorientador: Ícaro dos Santos Cabral
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Amazonas.

1. degradação ruminal. 2. silagem. 3. temperatura. 4. protease. 5. amilase. I. Lima, Ronaldo Francisco de. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

18/11/2020

SEI - Documento para Assinatura

Processo: 23105.036873/2020-30 Documento: 0345226



Ministério da Educação
Universidade Federal do Amazonas
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado do Paulo Henrique Carloni Fleury Curado.

Aos vinte e dois dias do mês de outubro de dois mil e vinte às 09h00, **Paulo Henrique Carloni Fleury Curado**, realizou a Defesa de Dissertação de Mestrado em amiloglucosidase e pepsina ao longo do tempo de ensilagem do milho grão moído e reidratado. Em face à Emergência Sanitária por COVID-19, tomando-se 36/2020 de 19/03/2020 e o Ofício Circular da PROPESP/UFAM nº 009/2020 de 30/03/2020, e diante da impossibilidade de realização da Defesa na forma Pres realizada através de sessão de videoconferência utilizando a plataforma Zoom.

Banca Examinadora:

MEMBROS	PARECER	ASSINATURA
Dr. Ronaldo Francisco Lima (UFOPA) – Presidente	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura eletrônica no final do documento
Dr. Carlos Victor Lamarão Pereira (UFAM) – Membro	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura eletrônica no final do documento
Dr. Jomel Francisco dos Santos (IFAM) – Membro	Aprovado (X) Reprovado ()	Assinatura eletrônica no final do documento

https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=usuario_externo_documento_assinar&id_acesso_externo=883&id_documento=397423&id_orgao_acesso_externo=0&infra_hash=9beb2d76c8efe7ce53475... 1/4

18/11/2020

SEI - Documento para Assinatura

Processo: 23105.036873/2020-30 Documento: 0345226

Resultado Final:	Aprovado (X)
	Reprovado ()

em Manaus, 22 de outubro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por Carlos Victor Lamarão Pereira, Professor do Magistério Superior, em 22/10/2020, às 11:12, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Ronaldo Francisco de Lima, Usuário Externo, em 22/10/2020, às 11:17, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Jomel Francisco dos Santos, Usuário Externo, em 22/10/2020, às 11:18, conforme horário oficial de Manaus, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

18/11/2020

SEI - Documento para Assinatura

Processo: 23105.036873/2020-30 Documento: 0345226



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0345226 e o código CRC 3685C545.

Av. General Rodrigo Octávio, 6200 - Bairro Coroado I Campus Universitário Senador Arthur Virgílio Filho, Setor Sul, Bloco FCA/ICB (Pós-Graduação), 2º andar,
Sala C12 - Telefone: (92) 99128-7971
CEP 69080-900, Manaus/AM, ppgcan.ufam@gmail.com

Referência: Processo nº 23105.036873/2020-30

SEI nº 0345226

https://sei.ufam.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=usuario_externo_documento_assinar&id_acesso_externo=883&id_documento=397423&id_orgao_acesso_externo=0&infra_hash=9beb2d76c8efe7ce53475... 3/4

DEDICATÓRIA

A minha amada esposa Juliana que me incentivou a iniciar esta empreitada e me acompanhou a cada passo, apoiou cada etapa, torceu por mim a cada desafio enfrentado, e comemorou cada vitória com alegria e entusiasmo.

Aos meus filhos Isadora, Júlia e Lucas, e aos meus netos Isis e Leonardo, que tiveram de compartilhar a atenção em competição à realização deste desafio. Espero que esta vitória demonstre a importância de perseverar em seus objetivos e também sirva de inspiração a eles em suas vidas acadêmicas.

A minha mãe Lúcia que sempre se dedicou incondicionalmente à educação dos filhos, contemplando nossas conquistas, frutos de uma criação moral ilibada.

In memoriam: ao meu pai José Adair, ao meu avô Romeu, e a minha avó Maria que são e sempre serão meus exemplos inspiradores de carinho e afeição.

A minha avó Terezinha pelo amor que sempre me dedicou e pela prontidão em sempre servir.

Aos professores e mestres, amigos e colegas que me incentivaram e apoiaram nas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Ao querido Professor e Orientador Ronaldo Francisco de Lima, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência, pelo carinho e pelo apoio incondicional e incentivo nos momentos necessários.

Ao Professor e amigo Carlos Victor Lamarão Pereira pelo carinho, pelos exemplos profissionais, pelos desafios propostos, e pela sua disponibilidade sempre que solicitada.

RESUMO

Este estudo avaliou diferentes dias de ensilagem de milho grão moído e reidratado, com ou sem adição de pepsina e amilase. Os tratamentos seguiram um fatorial $2 \times 2 \times 5$. O milho foi dividido em grupos com amilase (A), pepsina (P), ambas (AP) e controle (C), por 0, 15, 30, 60 e 90 dias. O milho moído foi umedecido a 40% de umidade e ensilado em silos experimentais de PVC. Termômetros coletaram a temperatura em cada silo a cada hora durante 25 dias. A temperatura média da silagem foi 21,6°C e a máxima 33,2°C. A amilase (22,0°C versus 21,2°C, $P < 0,01$) e pepsina (22,1°C versus 21,0°C, $P < 0,01$) reduziram a temperatura interna dos silos. A pepsina proporcionou maior degradação das prolaminas e maior degradação ruminal quando ensilada por 90 dias, em comparação com a não ensilada, um aumento de 29,8 para 41,4%, 31,8 para 45,3%, 45,1 para 63,2% e 69,8 para 86,1% ($P < 0,04$) nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas de incubação ruminal respectivamente. A pepsina maximizou a degradação inicial das proteínas hidrofóbicas do amido de milho. A ensilagem por 90 dias melhorou a degradação ruminal da MS. A pepsina melhorou a degradabilidade ruminal em todos os momentos e a amilase não a afetou.

Palavras-chave: degradação ruminal, silagem, temperatura, protease, amilase.

ABSTRACT

This study evaluated different ensilage days of ground and rehydrated corn grain, with or without addition of pepsin and amylase. The treatments obeyed a 2×2×5 factorial. The corn was divided in groups with amylase (A), pepsin (P), both (AP), and control (C), for 0, 15, 30, 60 and 90 days. The ground dry corn was moistened to 40% humidity and ensiled in experimental PVC silos. Electronic temperature recorders collected temperature in each silo every hour for 25 days. The silage average temperature was 21.6°C and the maximum temperature was 33.2°C. The addition of amylase (22.0°C versus 21.2°C, P <0.01) and pepsin (22.1°C versus 21.0°C, P <0.01) reduced silos internal temperature. Pepsin provided greater degradation of prolamines, and greater ruminal degradation when ensiled for 90 days, compared to not ensiled, an increase from 29.8 to 41.4%, 31.8 to 45.3%, 45.1 to 63.2% and 69.8 to 86.1% (P <0.04) at times 3, 6, 12 and 24 hours of ruminal incubation respectively. Pepsin inoculation maximized the initial degradation of hydrophobic corn starch proteins. The 90-day silage time improved the ruminal degradation of dry matter. Pepsin improved the ruminal degradability of corn at all times and amylase did not affect it.

Keywords: ruminal degradation, silage, temperature, protease, amylase.

Abbreviations: PVC, polyvinyl chloride; DM, dry matter.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	7
SUMÁRIO	8
1 INTRODUÇÃO	9
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4 RESULTADOS	20
5 DISCUSSÃO	24
5.1 Temperatura e MS	24
5.2 pH	26
5.3 Nitrogênio Amoniacal (N-NH ³)	27
5.4 Prolaminas – Zeína	28
5.5 Degradabilidade Ruminal	28
6. CONCLUSÃO	30
7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	31

1 INTRODUÇÃO

A utilização de silagens para alimentação de ruminantes é uma realidade em todo o mundo. Porém o grande volume de produção de cultivares de milho se destina à colheita de grãos para uso em rações animais e alimentação humana. A utilização direta de milho grão moído e reidratado pode ser uma opção para facilitar a rotina das propriedades rurais e reduzir as perdas técnicas e econômicas ocasionadas na confecção de silagens de planta inteira.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial e segundo maior exportador de milho (FAO, 2019). Produz anualmente cerca de 99 milhões de toneladas e exporta aproximadamente 38 milhões de toneladas do grão, ou seja, 39% desse volume (CONAB, 2019). A alimentação animal representa entre 76% e 78% do consumo interno, sendo os bovinos responsáveis por 8,5% desse total (EMBRAPA, 2015).

Apesar de ser uma commodity agrícola, existem vários tipos de milho de acordo com o padrão de composição, qualidade, quantidade e coloração do seu endosperma. Essas diferenças de armazenagem do amido no endosperma afetam diretamente a digestibilidade dos grãos quando fornecidos aos animais. A escolha do tipo original a ser explorado não priorizou a eficiência nutricional e seguiu uma separação geográfica e histórica conforme necessidades de adaptação ambiental, produtividade, tolerância climática e resistência natural a insetos (MLADENOVIC *et al.*, 2019), afetando diretamente o desempenho animal por apresentar baixa degradabilidade ruminal.

As cultivares de milho produzidos e comercializados no Brasil são predominantemente de tipo duro, com grãos vítreos, redondos e lisos, endosperma de alta densidade e rico em matriz proteica, diferentemente de regiões de clima temperado onde prevalece o tipo dentado ou farináceo. Apesar da fraca relação entre dureza dos grãos e sua suscetibilidade à quebra ou fragmentação por impacto, o mercado brasileiro priorizou materiais genéticos do tipo duro ou semiduro (McALLISTER *et al.*, 1993; CORRÊA *et al.*, 2002; DUARTE *et al.*, 2007; ECKERT *et al.*, 2018). Essa característica exige processamento dos grãos para seu melhor aproveitamento pelos animais.

O endosperma é composto principalmente por amido envolto em matriz proteica organizada de duas formas. O endosperma vítreo, duro, coeso ou córneo, possui o amido em forma de favo de mel, altamente compactado e incorporado nessa matriz proteica. Já o endosperma farináceo possui grandes grânulos de amido esféricos, folgadoamente e fracamente organizados, além de não incorporados por matriz proteica. As diferenças na proporção de

cada um são responsáveis pelas características do grão e por sua digestibilidade e valor nutritivo (SODERLUND, 2006; OWENS, 2007; ECKERT *et al.*, 2018; SINGH, 2019).

Esse amido do endosperma que precisa ser acessado e digerido é classificado de acordo com sua estrutura física e química, além de sua suscetibilidade à hidrólise enzimática. Compõe 80 a 85% do endosperma do grão e possui diferentes granuloses e formatos. É formado por dois distintos polímeros de glicose: 15 a 25% de amilose e 75 a 85% de amilopectina (SODERLUND, 2006; ECKERT *et al.*, 2018), apesar de existir no mercado variedades de milho com até 65% de amilose (PRADYAWONG, 2018).

Já a fração proteica do endosperma é composta por proteínas de reserva divididas em frações zeínas (prolaminas) e não-zeínas (albumina, globulinas e glutelinas) (GIBBON e LARKINS, 2005). As prolaminas são proteínas importantes na nutrição de ruminantes e estão associadas ao amido presente nos cereais com nomes específicos como a gliadina do trigo, a kafirina do sorgo e a zeína do milho (HOFFMAN e SHAVER, 2011).

As prolaminas são proteínas do endosperma com alta concentração de prolina. Para Momany *et al.* (2006), a prolina é um aminoácido altamente hidrofóbico capaz de dobragens complexas, assim as proteínas com um elevado teor de prolina desenvolvem estruturas terciárias que são altamente hidrofóbicas. Segundo Shukla e Cheryan (2001), a zeína possui 10% de prolina em sua composição.

As zeínas representam de 50 a 60% da proteína presente no grão de milho (HAMAKER *et al.*, 1995), e aumentam com o avanço da maturidade do grão, encapsulando o amido dentro de uma matriz de proteínas hidrofóbicas (MU-FORSTER e WASSERMAN, 1998; BUCHANAN *et al.*, 2000) e, conseqüentemente, impedindo o acesso de enzimas digestivas ou bactérias para fazer a hidrólise do amido. Por serem hidrofóbicas, são insolúveis em solventes normais para o ambiente e microbiota ruminal (LAWTON, 2002).

Potencialmente, a digestão do amido requer primeiro a degradação da zeína via proteólise, antes da atividade amilolítica (COTTA, 1988). A proteólise da zeína é, portanto, um passo limitante na taxa de digestão do amido.

A matriz proteica que envolve os grânulos de amido do milho também limita sua digestibilidade no ambiente ruminal. A matriz de proteína de amido em milho foi previamente definida como um impedimento físico-químico para digestão de amido em ruminantes (OWENS *et al.*, 1986). A digestibilidade está negativamente associada à maior presença de prolaminas.

De acordo com Owens *et al.* (1986) e McAllister *et al.* (2007), o local, a taxa e a extensão da digestão ruminal do amido de cereais depende de uma série de interações

complexas entre microrganismos do rúmen, espécies, tipo e estrutura do grão e do método de processamento de grãos.

A fermentabilidade do amido proveniente do grão de milho no rúmen pode determinar o desempenho animal. Uma vez que, o ganho em produção de proteína microbiana a partir de amido fermentável no rúmen pode resultar em aumento no fluxo de aminoácidos de origem microbiana do trato digestivo para o sangue.

A fermentação ruminal do amido pode variar de menos de 50% a mais de 90% e, é em função da taxa de fermentação e tempo de retenção das partículas do alimento no rúmen (GRANT, 2005). O aumento da extensão da degradação ruminal pelo processamento e adição de aditivos externos como proteases e amilases é vantajoso para o animal em termos de utilização total do amido e também no possível aumento de produção de proteína microbiana, o que aumenta o fluxo de aminoácidos (aa) para o intestino (THEURER, 1986).

A ensilagem de grão de milho reidratado e devidamente tratado com enzimas eficazes pode ser uma importante alternativa para aumentar a digestibilidade do amido, considerando uma potencialização dos ácidos da fermentação e potencializando o processo de proteólise para degradação da zeína durante o processo fermentativo (BARON *et al.*, 1986).

A adição de proteases exógenas e amilases no material a ser ensilado podem melhorar a degradação do grão e conseqüentemente a disponibilidade de energia, proteína e nutrientes aos ruminantes. Conhecer o comportamento do material inoculado durante o processo fermentativo, bem como os resultados oriundos da inclusão desses aditivos pode significar a viabilidade econômica ou técnica para um uso em maior escala desses materiais. Além disso, os produtores poderão produzir sua silagem de grão úmido moído e reidratado através da aquisição do grão diretamente no mercado produtor, contornando tanto as dificuldades na produção e colheita da silagem, quanto na questão sazonal de preços.

Objetivou-se, com esse trabalho, avaliar a digestibilidade ruminal do milho duro brasileiro com a quebra enzimática de prolaminas, através da melhora no processo fermentativo de silagens de grãos de milho reidratados, ensilados por diferentes tempos e adicionados de amilases e pepsinas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O grão de milho morfológicamente possui quatro diferentes estruturas químicas e organizacionais: endosperma (80 a 85%), gérmen (10 a 11%), pericarpo (5 a 6%), e a ponta (0,8 a 2%) (PAES, 2006; SODERLUND, 2006; BITENCOURT, 2012; SINGH, 2019). Considerando a matéria seca, apresenta composição média de 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibra e 4% de óleo (PAES, 2006). Essas variações em suas características físicas afetam diretamente sua degradabilidade ruminal (PHILIPPEAU *et al.*, 1999).

A disponibilidade de amido para hidrólise enzimática influencia a forma como os cereais são digeridos por ruminantes (HUNTINGTON, 1997; CROCKER *et al.*, 1998; MILLS *et al.*, 1999; OFFNER *et al.*, 2003). Essa susceptibilidade também determina a quantidade de energia obtida pelo animal. Para melhorar a digestão do amido e o desempenho animal, o milho e outros grãos de cereais normalmente são processados antes de servirem de alimento (DEPETERS *et al.*, 2006).

Quanto maior a vitreosidade do grão, menor a digestibilidade do amido no rúmen (McALLISTER *et al.*, 1990; PHILIPPEAU e MICHALET-DOREAU, 1997; PHILIPPEAU *et al.*, 1999; CORREA *et al.*, 2002; TAYLOR e ALLEN, 2005; NGONYAMO-MAJEE *et al.*, 2008). Além do efeito direto da vitreosidade sobre a solubilidade e o acesso enzimático ao amido no grão (McALLISTER *et al.*, 1990), maior fluxo intestinal de amido não degradável no rúmen em dietas contendo milho duro, pode exceder a capacidade digestora de amido do intestino delgado (MATTHÉ *et al.*, 2001), resultando em queda na digestibilidade do amido no intestino e no trato digestivo total (TAYLOR e ALLEN, 2005; ALLEN *et al.* 2008), especialmente para grãos duros em estágio maduro de maturação (PEREIRA *et al.*, 2004).

Philippeau *et al.* (2000) quantificaram uma correlação positiva entre vitreosidade e concentração de zeína no milho, concluindo que os milhos mais vítreos contêm mais zeína do que os menos vítreos. Estes dados definem as diferenças na composição química entre o endosperma vítreo e endosperma farináceo (HOFFMAN e SHAVER, 2011).

Essa melhora na degradação ruminal do amido aumenta a disponibilidade de energia rapidamente fermentável no rúmen, podendo aumentar a produção de proteína microbiana e de ácidos graxos voláteis totais (NOCEK e TAMMINGA, 1991), pelo fato de reduzir as barreiras que impedem o acesso enzimático aos componentes nutricionais (McALLISTER *et al.*, 1990; POND *et al.*, 1995).

Durante a ensilagem ocorre proteólise por enzimas microbianas da matriz proteica envolvendo os grânulos de amido, capaz de atuar positivamente sobre a digestibilidade do amido em grãos de alta vitreosidade (BARON *et al.*, 1986, HOFFMAN *et al.*, 2011). Essa proteólise, no processo de ensilagem, aumenta o teor de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) (HOFFMAN *et al.*, 2011). A silagem de milho grão maduro e reidratado é uma forma de armazenamento do grão na fazenda e pode aumentar a digestibilidade ruminal do amido (PEREIRA *et al.*, 2011).

Avaliando a relação entre ensilagem, nitrogênio amoniacal e digestibilidade ruminal de amido *in vitro* em amostras de milho de alta umidade, Ferraretto *et al.* (2014), observaram correlações positivas entre a digestibilidade ruminal *in vitro* do amido e o teor de N-NH₃, e concluíram que o aumento da digestibilidade do amido coincidiu com aumento das concentrações de N-NH₃, assim, afirmaram que o índice de nitrogênio amoniacal é um bom indicador de digestibilidade ruminal *in vitro* do amido em silagens de milho. A ensilagem do grão reidratado tem mostrado ser uma técnica interessante na melhora da digestibilidade do amido do milho (BENTON *et al.*, 2005).

Na ensilagem de grãos maduros é necessária a hidratação para obter teor de umidade ideal em torno de 40% (MOMBACH, 2019) ou até mesmo superior a 30% da matéria natural (ANDRADE FILHO *et al.*, 2010b; PEREIRA, 2011), propiciando o armazenamento e posterior uso na alimentação animal (TONROY *et al.*, 1974; GOODRICH *et al.*, 1975; DEFOOR *et al.*, 2006).

Jurjanz e Monteils (2005) observaram menor degradabilidade ruminal efetiva do amido em grãos de milho antes (70,2%) do que depois (92,3%) da ensilagem. Em estudo recente, (HOFFMAN *et al.*, 2011) acompanharam o destino da matriz proteica em silagens de grão úmido de milho armazenadas por 240 dias e observaram que a ensilagem reduziu as concentrações de zeína ao longo do tempo.

A ensilagem do milho duro pode contrapor o efeito negativo da textura sobre a digestibilidade do grão (PHILIPPEAU e MICHALET-DOUREAU, 1998; ANDRADE FILHO *et al.*, 2010). Pereira (2011) comparou a digestibilidade *in vitro* da silagem de grãos de milho reidratados, com moagem fina ou grosseira e com crescentes tempos de armazenamento, 0, 14, 28, 56, 112, 168, 224 dias. Foi observado aumento na degradabilidade efetiva à medida que o tempo de armazenamento aumentou e também para a moagem fina em relação à grosseira, tanto em simulações para taxas de passagem de 5% quanto para 8%.

A fermentação do milho, como a que ocorre durante o armazenamento por ensilagem pode reduzir o teor de prolaminas do grão. Este fato explica o ganho em digestibilidade que

pode ocorrer em silagens de milho armazenadas por longo período (PEREIRA, 2011). Durante a ensilagem ocorre proteólise por enzimas microbianas da matriz proteica envolvendo os grânulos de amido, capaz de atuar positivamente sobre a digestibilidade ruminal do amido em grãos de alta vitreosidade. Junges (2017) descobriu que as bactérias são responsáveis por 60% da solubilização da proteína, enquanto enzimas do próprio grão 30%, fungos 5% e a fermentação de produtos finais mais 5%.

A ensilagem do milho, além de reduzir o teor de prolaminas do endosperma por degradação enzimática, também aumenta o teor de umidade do grão, o que pode reduzir o tempo entre a ingestão e o início da digestão no trato digestivo. Antes de sofrer degradação enzimática, as partículas alimentares necessitam ser hidratadas no trato digestivo, o que é mensurado em nutrição como taxa de hidratação (PEREIRA, 2011).

O amido é o principal componente de energia utilizado nos alimentos para ruminantes devido à sua disponibilidade (ORTEGA e MENDOZA, 2003). Segundo Huhtanen e Sveinbjörnsson (2006), nos ruminantes, o local da digestão de amido afeta os substratos absorvidos. A digestão ruminal gera ácidos graxos voláteis (AGV) para absorção e fornece energia para a síntese de proteínas microbianas.

O rúmen é considerado o principal local de digestão com amido (GÓMEZ, 2016). A digestão ruminal geralmente representa 75 a 80% da ingestão, e 35 a 60% do amido que entra no intestino delgado é degradado. De acordo com uma meta-análise de Moharrery *et al.* (2014), observou-se que, a digestibilidade do amido ruminal varia muito sendo de 224 a 942 g/Kg de amido ingerido. Os autores também observaram que o consumo de amido afetou negativamente a digestibilidade do amido ruminal, obtendo uma inclinação negativa de 1,4% por Kg na ingestão diária de amido.

Dentre os fatores que afetam a digestibilidade do amido, o tamanho do grânulo a forma como o mesmo se apresenta, é um fator limitante na digestão de amido porque a relação entre o volume de amido e a área superficial, e assim o contato substrato-enzima, diminui à medida que o tamanho do grão aumenta (SVIHUS *et al.*, 2005). Quanto menor o tamanho das partículas maior será a superfície de contato do alimento com os microrganismos ruminais e enzimas digestivas, favorecendo a digestão (REIS, *et al.*, 2014). San Emeterio *et al.* (2000) compararam os efeitos da granulometria do milho moído (3,28 e 1,11 mm) na alimentação de vacas confinadas, e observaram aumento na digestibilidade do amido, produção de leite e proteína, e redução no nitrogênio amoniacal no rúmen e nitrogênio uréico do leite para o milho moído mais fino.

Outro fator limitante da digestibilidade é a relação amilose/amilopectina que está correlacionada negativamente com a digestão do amido, mostrada em vários estudos (BEDNAR *et al.*, 2001). As proporções entre estes compostos variam entre espécies e variedades de grãos, influenciando a taxa de degradação e a digestibilidade do amido. Gouvêa (2012), afirma que o conteúdo de amilose no grão de milho tende a aumentar com maturidade fisiológica da planta.

Além disso, a qualidade do grânulo de amido é afetada pelo tipo de amido presente nele. O endosperma farináceo do milho apresenta alta proporção de amilopectina e as características do endosperma vítreo do milho flint ou duro estão associadas com o conteúdo de amilose (VAN SOEST, 1994). A amilopectina é o principal constituinte do amido do milho, cerca de 70 a 80% (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986). A digestibilidade do amido é inversamente proporcional ao teor de amilose. Desta forma, fontes de amido com maiores teores de amilopectina podem apresentar maior digestibilidade (JOBIM *et al.*, 2003).

As moléculas de amilose e amilopectina são mantidas unidas pelas pontes de hidrogênio, resultando em grânulos de amido com estruturas altamente organizada (NOCEK e TAMMINGA, 1991), o que confere aos grânulos íntegros, baixa capacidade de absorção de água por se apresentarem bastante estáveis (FLINT e FORSBERG, 1995).

Amilose é um polissacarídeo de cadeia linear de moléculas de glicose conectadas por ligações glicosídicas α -1,4, enquanto a amilopectina é um polímero solúvel em água e altamente ramificado, onde as moléculas de glicose estão conectadas com ligações glicosídicas α -1,4 e a ramificação ocorre nas ligações glicosídicas α -1,6, a cada 24 a 630 unidades de glicose (PRADYAWONG, 2018). Uma alta proporção de amilose para amilopectina está negativamente correlacionada com digestão de amido (ZHAO, 2018).

Como a amilose é um polímero de cadeia linear, se alinha com numerosas ligações de hidrogênio, dificultando a ação das enzimas, resultando em hidrólise reduzida de amilose. Altas temperaturas proporcionadas durante a moagem de amidos no processo convencional de moagem a seco ajudam a quebrar essas ligações de hidrogênio e a amilose disponível para enzimas. (PRADYAWONG, 2018). Além disso, trabalhos indicam que amidos com alta concentração de amilopectina expandem mais que aqueles com alta concentração de amilose (VANIER *et al.*, 2016).

Diversos tipos de processamento são aplicados aos grãos de cereais com a finalidade de romper as pontes de hidrogênio dentro dos grânulos de amido, melhorando a sua capacidade de hidratação. Dessa forma, o amido torna-se mais susceptível à digestão enzimática (FLINT e FORSBERG, 1995). Quando processados os grânulos de amido estão

sujeitos à gelatinização, que corresponde à perda irreversível de sua estrutura original em função de alguma energia aplicada, que será responsável pela quebra dessas pontes de hidrogênio (NOCEK e TAMMINGA, 1991). Esse processo pode ser provocado por diversos fatores como agentes térmicos, mecânicos, químicos ou então por possíveis combinações entre os mesmos (GOUVÊA, 2012).

A gelatinização provoca maior capacidade de absorção de água, e perda da estrutura cristalina que expõem uma maior parte da amilose, tornando o amido mais susceptível à degradação enzimática (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986; MELLO JR, 1991; GOUVÊA, 2012). A digestibilidade do amido do grão de milho é limitada também pela matriz proteica que é uma estrutura amorfa com função estrutural no grão, e que encapsula os grânulos de amido.

A região cristalina ou micelar é composta primariamente por amilopectina. Essa região apresenta elevada resistência à água e ao ataque enzimático. Já a região amorfa ou também conhecida como fase gel é rica em amilose e apresenta uma menor densidade que a região cristalina. Na região amorfa existe livre movimento de água e o ataque enzimático pela amilase ao grânulo ocorre nessa região. Modificações químicas do amido, como a quebra de ligações, afetam primariamente a região amorfa do grânulo. (ROONEY e PFLUGFELDER, 1986; WANG *et al.*, 1998). Essa matriz está presente principalmente no endosperma vítreo dos grãos e a quebra da matriz proteica pode melhorar a velocidade e a extensão da digestão do amido (McALLISTER *et al.*, 1990 e 1993).

Conforme conceituadas por Reed (1975), as enzimas responsáveis pela degradação de amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas estão as amilases que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as glucoamilases (amiloglucosidases), as quais liberam unidades de glicose do terminal não redutor das moléculas do substrato.

Complexos enzimáticos (enzimas fibrolíticas, amilolíticas e proteolíticas) têm sido utilizados em conjunto com inoculantes bacterianos no processo de ensilagem, os quais são conhecidos como inoculantes bacteriano-enzimáticos (REIS, *et al.*, 2015). Devido à natureza hidrofóbica, a zeína se torna uma grande barreira que dificulta o acesso ao amido de milho por enzimas. Proteases de ácido são comumente usadas para aumentar o rendimento de fermentação de milho (WANG *et al.*, 2009) para superar esta barreira. Pesquisas mostraram que o pré-tratamento de alimentos com proteases melhora a digestão de amido por bactérias

do rúmen (McALLISTER *et al.*, 1993; DEPETERS *et al.*, 2006; HOFFMAN *et al.*, 2011; KUNG, 2014).

Kung *et al.* (2014), ao avaliarem o efeito de uma protease exógena na silagem de milho de alta umidade, observaram que o tratamento do milho com protease diminuiu a concentração de proteínas prolaminas em 26 e 42%, após 70 e 140 dias de fermentação, respectivamente, e aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal, além de aumentar a digestibilidade ruminal *in vitro* do amido.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos de cuidado e manejo dos animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e aprovados pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal (CEUA) da Universidade Federal do Amazonas - UFAM - Manaus, Brasil, sob o protocolo de nº 080/2019.

Para a realização do experimento, 400 kg de grãos de milho híbrido desconhecido foram moídos em desintegrador tipo martelo DPM Júnior (Nogueira Máquinas Agrícolas, São João da Boa Vista, SP), equipado com peneira de 5 mm. O milho moído foi separado em quatro partes de 100 kg cada. Em seguida, o milho moído foi hidratado a 40% de umidade (denominado milho reidratado), adicionado ou não adicionado de 200 g/t de pepsina (Pepsina 1:1000, Cromato Produtos Químicos Ltda, Diadema - SP) e/ou 200 ml/t de amiloglucosidase termicamente resistente (Termamyl®), e ensilada por 0, 15, 30 e 60 dias em silos experimentais de PVC com diâmetro de 10 cm e altura de 50 cm, capazes de armazenar aproximadamente 05 kg de milho grão reidratado. Amostras de cada silo foram obtidas e refrigeradas a -20°C para ser considerado o tempo de ensilagem zero. Cada tratamento teve cinco repetições, totalizando ao final, 100 unidades experimentais conduzidas em fatorial 2x2x5, compondo vinte tratamentos com cinco repetições cada, sendo: milho com amilase e pepsina (AP); milho com amilase e sem pepsina (A); milho com pepsina e sem amilase (P); ou milho sem amilase e sem pepsina controle (C), ambos ensilados por 0, 15, 30 ou 60 dias.

Todos os tratamentos foram inoculados com $6,0 \times 10^5$ UFC/g de *Lactobacillus plantarum* (Lallemand Brasil, Aparecida de Goiânia - GO). Em oito silos, dois em cada tratamento do tempo de 30 dias, foi adicionado um termômetro eletrônico (Tagtemp-usb, Novus, Porto Alegre, RS) para coletar a temperatura a cada hora durante 25 dias. Para o cálculo das perdas de matéria seca (MS), a diferença no peso de MS de cada silo foi medida pelo peso dos silos antes e após cada tempo de silagem.

Os silos foram armazenados em sala climatizada com temperatura controlada de 20°C. Após o término do tempo de ensilagem, amostras de 500 g de silagens de milho reidratadas foram congeladas a -20°C até novas análises químicas. Amostras dos silos por 90 dias foram congeladas por 30 dias para garantir a continuidade do protocolo. Todas as amostras foram então descongeladas simultaneamente. Para a mensuração do pH ruminal e análise de N-NH₃, foi formado um extrato aquoso com 25 g de silagem de grãos reidratada de cada amostra e 225 ml de água deionizada e homogeneizado em liquidificador por 1 minuto. Imediatamente

após a homogeneização, o pH foi lido. Uma porção do homogenato foi filtrada em papel de filtro Whatman 54 (Whatman Ltd., Florham, NJ) e acidificada com 03 gotas de H₂SO₄ para reduzir o pH do extrato para <2,0. Este extrato acidificado foi congelado a -20°C para análise posterior N-NH₃ (AOAC, 1980).

Uma amostra de 100 g foi desidratada a 55°C em estufa de ventilação forçada por 48h. As amostras foram então moídas em peneira de 01 mm em moinho tipo Thomas-Willey. Uma subamostra moída de cada silo foi desidratada a 105°C por 24h para determinação do teor de MS. Em seguida, as amostras foram submetidas às análises de proteína bruta (A.O.A.C., 1990), prolaminas-zeína (Larson e Hoffman, 2008) e amido (HALL, 2009).

Um ensaio de degradabilidade ruminal da MS de grãos de milho reidratados foi realizado com duas novilhas zebuínas pesando aproximadamente 300 kg de peso vivo e cânula ruminal alimentada com dieta padrão contendo 50% de silagem de capim elefante e 50% de concentrado (MS base). Para o teste de degradabilidade, amostras de milho reidratado moído de cada tratamento e repetição foram desidratadas a 55°C por 72h e moídas a 02 mm em moinho tipo Thomas-Willey. Em seguida, 5g (base seca ao ar) de cada amostra de tratamento foram pesados em quadruplicado e colocados em sacos de náilon (10×20 cm, Tecnologia ANKOM). Os sacos de náilon foram incubados no rúmen das duas novilhas (dois sacos por período de tempo e por animal) por 0, 3, 6, 12 e 24h. Após a retirada das amostras do rúmen, os sacos foram colocados em água gelada para interromper a degradação e lavados com água corrente até que a água do enxágue ficasse límpida. O desaparecimento de zero hora foi estimado por meio da lavagem dos sacos em duplicata contendo as amostras dos tratamentos.

Resíduos de sacos de náilon em cada tempo de incubação foram analisados para MS como descrito acima. Dados de desaparecimento da MS dos sacos de náilon foram usados para determinar os parâmetros de degradação da MS nos tempos 3, 6, 12 e 24 horas.

Os dados foram analisados como um arranjo fatorial 2x2x5 de tratamentos com fatores incluindo adição ou não de amiloglucosidase resistente ao calor em silagens, adição ou não de pepsina em silagens em 05 tempos de armazenamento (0, 15, 30, 60 e 90 d). Os dados foram analisados usando o procedimento GLM do SAS (1989). Os principais efeitos incluíram pepsina, amilase resistente ao calor, tempo de ensilagem e suas interações.

4 RESULTADOS

A temperatura média da silagem durante os primeiros 25 dias de ensilagem foi de 21,6°C, e a temperatura máxima atingida foi de 33,2°C (tab. 1).

Tabela 1 - Temperatura da silagem de grão de milho reidratado submetido ao tratamento por 25 dias.

Temperatura, °C	P ¹		Sem Pepsina		EPM	P	A	A*P ⁴	T ⁷	A*P*T ⁸
	P ¹	PA ²	A ³	Controle						
Temp. Média	21,2	20,8	21,5	22,7	0,07	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Temp. Máxima	33,1	33,2	32,2	31,8	0,26	0,01	0,38	0,59		

¹Pepsina; ²Pepsina e amilase; ³Amilase; ⁴Interação amilase e pepsina; ⁵Tempo; ⁶Interação amilase, pepsina e tempo.

A adição de amilase (22,0°C versus 21,2°C, P <0,01) e pepsina (22,1°C versus 21,0°C, P <0,01) reduziu o aumento da temperatura interna dos silos. Assim que os silos foram fechados, observou-se aumento da temperatura interna, seguido de queda significativa nas primeiras 24 horas. A temperatura diária dos silos oscilou até 3°C (Fig. 1).

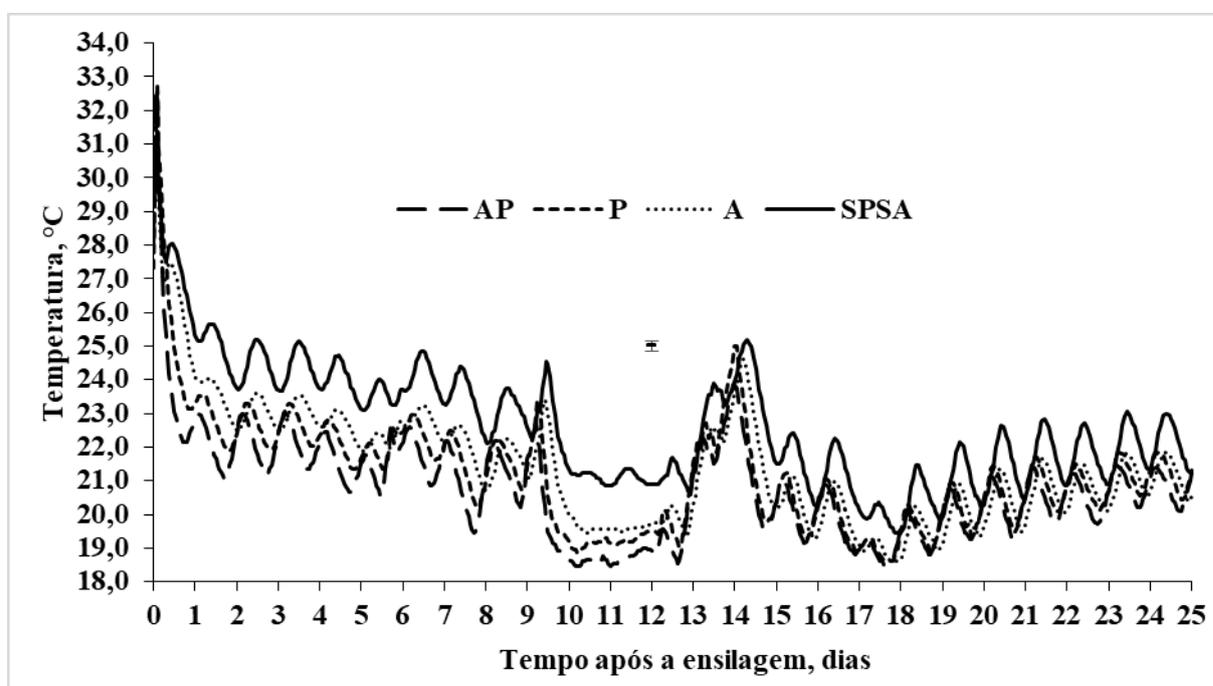


Figura 1 - Temperatura de silagem de grão de milho reidratado submetidos a tratamentos de amilase (A), pepsina (P), amilase e pepsina (AP) e controle sem pepsina e sem amilase (SPSA) coletada a cada hora por 25 dias.

Os dados de MS, pH, PB, amido, zeína e N-NH₃ de milho moído, reidratado e ensilado por 90 dias e submetido ao tratamento com amilase e/ou pepsina são apresentados na tabela 2. A MS média da silagem de milho foi $61,2 \pm 1,1\%$ ao final do tempo de ensilagem. O teor de MS não foi afetado pelos dias de ensilagem, sendo semelhante entre os tratamentos.

Tabela 2 - Resultados de matéria seca (MS), pH, e concentração de proteína bruta (PB), amido, prolamina-zeína, e nitrogênio amoniacal (N-NH₃) em porcentagem da MS da ensilagem de milho reidratado e submetido à amiloglucosidase e pepsina por 90 dias.

	P ¹		SP ²		EPM ⁵	P	A	A*P ⁶	T ⁷	A*P*T ⁸
	A ³	SA ⁴	A	SA						
Matéria Seca %	60.3	62.3	61.0	61.3	0.75	0.16	0.21	0.32	0.28	0.81
pH	4.43	4.46	4.41	4.42	0.005	<0.01	<0.01	0.02	<0.01	0.96
Proteína Bruta %	8.68	8.37	8.29	8.66	0.1687	0.75	0.85	0.05	0.64	0.92
Amido %	73.3	71.8	72.5	73.0	3.58	0.31	0.25	0.26	0.51	0.28
Zeína %	0.98	0.65	1.98	2.17	0.067	<0.01	0.33	<0.01	<0.01	0.01
N-NH ₃ %	0.100	0.102	0.068	0.070	0.0027	<0.01	0.40	0.86	<0.01	0.68

¹pepsina, ²sem pepsina, ³amilase, ⁴sem amilase, ⁵erro padrão da média, ⁶interação amilase pepsina, ⁷tempo, ⁸interação amilase pepsina tempo.

O pH aos 90 dias não apresentou variação significativa entre os tratamentos. Porém, a adição de pepsina mostrou menor redução do pH da silagem de grãos de milho reidratados ($P < 0,01$). Houve queda significativa na redução do pH quando a pepsina ($P < 0,01$) foi adicionada em diferentes níveis à silagem de grãos de milho moída e reidratada (dados não publicados). A adição de amilase neste experimento não alterou o pH ao longo do tempo de ensilagem dos grãos reidratados.

As concentrações de zeína em porcentagem da MS ao longo dos tempos de ensilagem estão descritas na tabela 2 e representadas na figura 2 para um melhor entendimento das interações entre amilase, protease e tempo. A adição de pepsina reduziu o teor de zeína do amido de milho após 15 dias de silagem, com redução linear contínua até o dia 90. A adição de amilase não afetou o teor de zeína no milho.

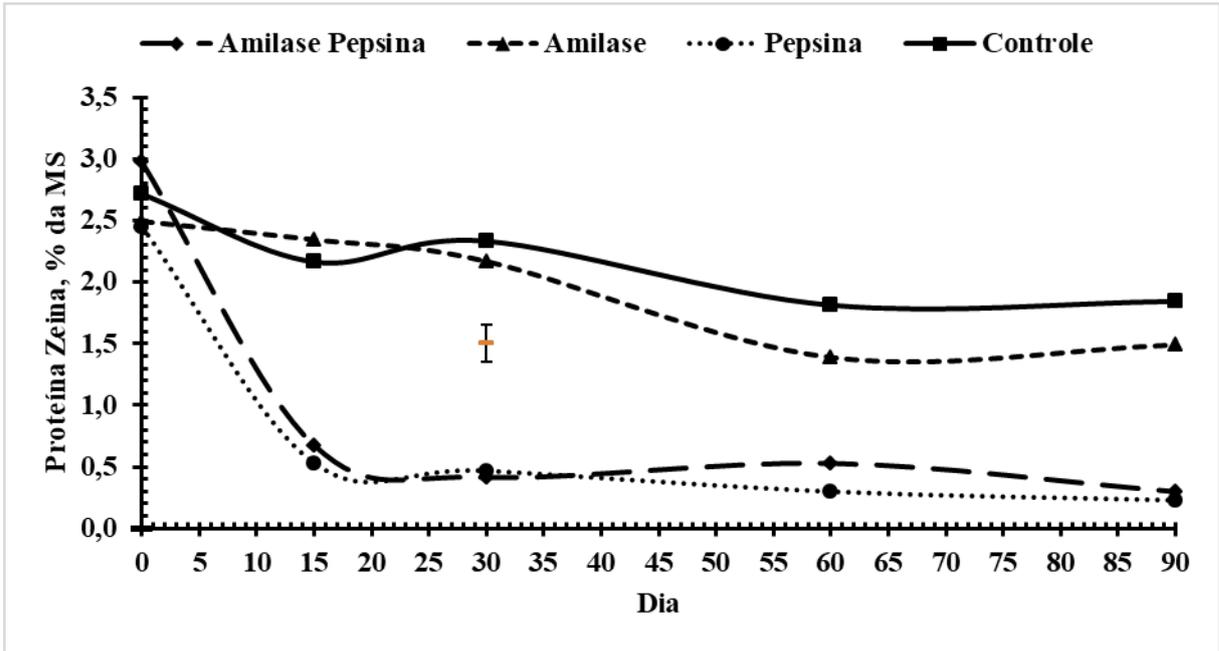


Figura 2 - Concentração de proteínas zeínas em porcentagem da MS da ensilagem de milho grão moído e reidratado submetido à amiloglicosidase e pepsina por 0, 15, 30, 60 e 90 dias.

As concentrações de N-NH₃ na silagem de milho aumentaram em todos os tratamentos e tempos de armazenamento (Fig. 3). A amilase não afetou o teor de N-NH₃, mas a adição de pepsina aumentou o teor de N-NH₃ em 0,04% quando comparado ao controle.

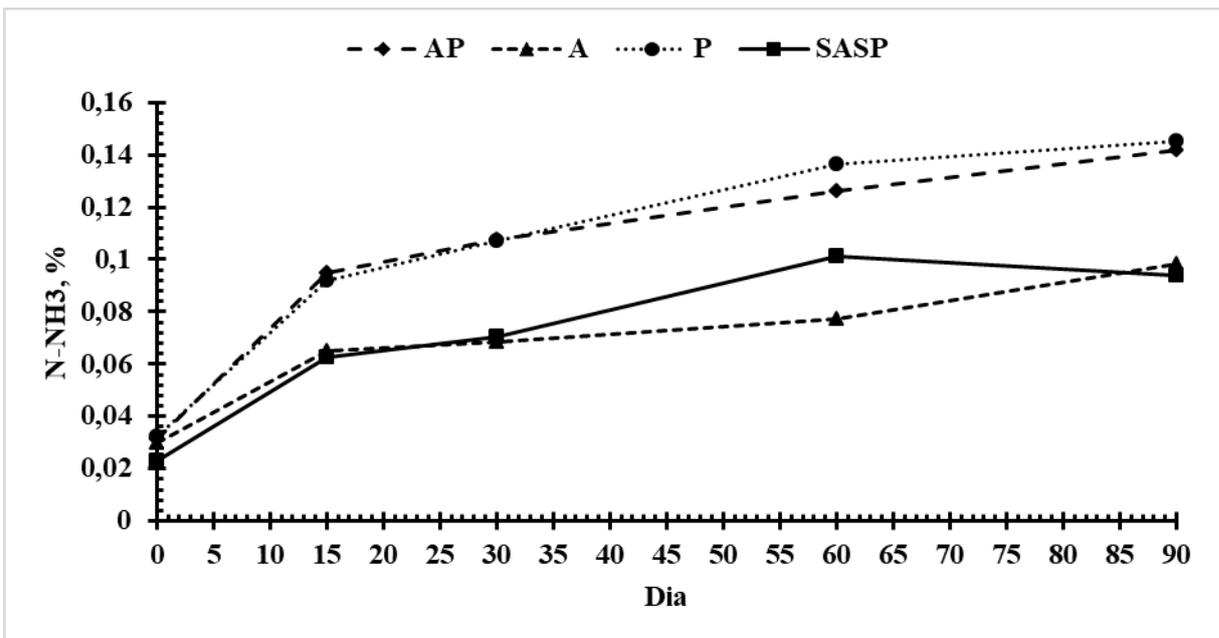


Figura 3 - Concentração de amônia em porcentagem da MS da ensilagem de milho grão moído e reidratado submetido à amiloglicosidase e pepsina por 0, 15, 30, 60 e 90 dias.

Tabela 3 - Degradabilidade ruminal da matéria seca (% do incubado) de milho grão moído e reidratado incubados por 3 (Deg 3), 6 (Deg 6), 12 (Deg 12) e 24 horas (Deg 24) de incubação submetidos a 0, 15, 30, 60 e 90 dias de ensilagem.

	Tempo de ensilagem					EPM	P
	0	15	30	60	90		
Deg 3	29,8b	35,1ab	33,6ab	36,34ab	41,4a	2,57	0,04
Deg 6	31,8b	37,5ab	42,9ab	43,61a	45,3a	2,90	<0,01
Deg 12	45,1c	51,4bc	59,4ab	57,61ab	63,2a	2,91	<0,01
Deg 24	69,8c	76,6bc	77,6abc	82,0ab	86,1a	2,34	<0,01

EPM=erro padrão da média, P=efeito de tempo de ensilagem. Médias seguidas de mesma letra nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

O tempo de ensilagem aumentou a degradação ruminal da MS do milho, quando incubado por 3, 6, 12 e 24 horas (Tab. 3). A degradabilidade ruminal da MS do milho observada na incubação ruminal por 12 horas, foi superior em 17,6 pontos percentuais no material ensilado por 90 dias quando comparado ao material não ensilado.

A adição de amilase não alterou a degradabilidade da MS do milho. A degradabilidade ruminal da matéria seca da silagem de milho foi aumentada com a adição de pepsina em todos os momentos de ensilagem (Tab. 3, 4). Houve aumento médio de 10,9 pontos percentuais nos diversos tempos de degradabilidade ruminal da matéria seca do milho quando este foi ensilado várias vezes e adicionado de pepsina. A adição de pepsina em silos de grãos de milho reidratados e ensilados por 90 dias proporcionou aumento na degradabilidade ruminal de 9,25, 9,13, 10,49 e 7,2 pontos percentuais quando incubados no rúmen por 3, 6, 12 e 24 horas, em comparação aos tratamentos ensilados sem pepsina.

Tabela 4 - Degradabilidade ruminal da matéria seca (%do incubado) por 24 horas (Deg24), 12 horas (Deg12), 6 horas (Deg6) e 3 horas (Deg3) de milho grão reidratado e ensilado por noventa dias adicionados ou não pepsina e amilase.

	P ¹		SP ²		EPM ⁵	P-valor		
	A ³	SA ⁴	A	SA ⁴		P	A	A*P ⁶
Deg 24	83,5	80,6	73,6	76,1	2,26	<0,01	0,95	0,23
Deg 12	60,7	60,5	52,11	48,12	2,69	<0,02	0,43	0,49
Deg 6	46,0	43,6	37,14	34,2	2,60	<0,01	0,31	0,92
Deg 3	38,2	40,6	33,8	26,5	2,29	<0,01	0,29	0,14

¹pepsina, ²sem pepsina, ³amilase, ⁴sem amilase, ⁵erro padrão da média, ⁶interação amilase pepsina.

5 DISCUSSÃO

5.1 Temperatura e MS

Conhecer a variação da temperatura no processo fermentativo durante a ensilagem de grãos de milho moídos e reidratados pode auxiliar na escolha do uso de enzimas e aditivos que maximizem a digestibilidade do amido. A produção de calor entre 5°C e 8°C é normal durante a fermentação de uma boa silagem (KUNG, 2017). O patamar de temperatura máximo atingido nesse estudo indica que houve pouca presença de ar nos silos, resultando em baixa oxidação aeróbica de Matéria Seca (MS) e beneficiando o processo fermentativo por microrganismos desejáveis (HILL e LEAVER, 2002). Além disso, a adição de amilase também não alterou a degradação da MS do milho nem o percentual de amido.

A silagem de grão de milho moído e reidratado apresentou nesse estudo um comportamento de variação de temperatura menor que aqueles relatados em literatura para silagens convencionais. Como não há respiração celular o material reidratado a 40% de umidade permitiu boa expulsão de ar e atividade de água. Dessa forma, o aumento inicial de temperatura foi curto em relação ao tempo, e pequeno em relação à amplitude, apresentando pico e queda em menos de 90min e Δt 7°C. Assim o encurtamento dessa primeira fase do processo fermentativo não possibilitou aumento significativo de temperatura (máx. 33°C) nem perda significativa de MS.

Rabelo (2012) citando Wooldord (1990) comenta que o aumento inicial da temperatura da silagem decorre do crescimento de leveduras e fungos filamentosos. Também encontrou um segundo aumento de temperatura às 120 horas de avaliação em consequência de bacilos que iniciam as atividades em pH abaixo de 5,0 conforme citou Muck & Pitt (1992), Isso pode explicar a oscilação de temperatura encontrada entre os dias 09 e 14 do experimento, mas essa diferença provavelmente não é biologicamente relevante.

Zhou (2016) demonstrou que a gradiente de temperatura impacta diretamente na diversidade e comunidade da população de bactérias produtoras de ácido lático e observou que temperaturas na faixa de 20 a 25°C resultaram em rápida acidificação da forragem e rápido declínio do pH, o que foi verificado no experimento e não ocorre em temperaturas menores.

Temperatura e concentração de sais também são importantes fatores que influenciam a ativação de enzimas (UNIACKE-LOWE, 2017). Das enzimas utilizadas, a amiloglicosidase é termo resistente e suporta temperaturas de até 100°C, e não seria afetada mesmo em casos de

calor excessivo no processo. Essas enzimas rompem as ligações no interior do substrato, atuando sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações glicosídicas α -1,4. A adição de amilase reduziu a temperatura média das silagens ao longo do período de ensilagem, indicando que pode ter ocorrido melhor perfil de fermentação do milho disponibilizando maior quantidade de carboidratos solúveis para as bactérias produtoras de ácido láctico (ROTZ e MUCK, 1994). Nesse mesmo sentido, Oliveira (2019) identificou que a adição de enzimas amilolíticas em milho grão moído, reidratado, e ensilado (Temperatura da sala de armazenamento $28.5 \pm 2.3^{\circ}\text{C}$) por 45 dias aumentaram ($P \leq 0,027$) a contagem de bactérias do ácido láctico, concentração de acetato e butirato na silagem.

Oliveira (2019) destaca ainda que as amilases são usadas para solubilizar amido em altas temperaturas e considera baixa temperatura entre $50\text{-}60^{\circ}\text{C}$ citando Taylor *et al.* (2008). Nos modelos matemáticos criados por Pitt (1990), ao considerar as bases bioquímicas, evidenciam que a atividade enzimática é afetada pela temperatura e atividade da água entre outros, e como não foram encontrados estudos relacionados às temperaturas relativamente baixas na silagem, o próprio autor partiu dos dados de altas temperaturas disponíveis e extrapolou para as temperaturas mais baixas na silagem.

A amilase utilizada é uma enzima que atua melhor em temperaturas acima de 37°C e dados do fabricante (TERMAMYL) mostram que abaixo de 32°C não há atividade. Resultado semelhante mostrado por Pitt (1990) apontando queda expressiva de atividade das amilases nas mesmas temperaturas. Importante destacar que apesar dessas temperaturas ideais não terem ocorrido nesse experimento, ocorrem fisiologicamente em ambiente ruminal para dietas aditivadas apresentando resultados positivos (ARTURO, 2018). Ainda assim houve redução de temperatura ($P < 0,01$) verificada nas silagens que receberam a amilase.

Collombatto (2004) não encontrou diferença estatística nos efeitos da adição de enzimas em silagem de milho armazenadas em duas diferentes temperaturas: 15°C e 39°C , com temperatura ambiente de 40°C . Considerou nesse estudo os dados de Pitt (1990) que demonstrou graficamente a queda de atividade relativa de amilases para temperaturas inferiores a 35°C , o que pode vir a ser uma realidade em silagens de milho grão moído e reidratado.

Desta forma torna-se necessário mensurar o impacto de temperaturas menores que 33°C na expressão da atividade catabólica das amilases, como observado nesse estudo, pois quando o processo atinge temperaturas superiores, a atividade enzimática passa a não ser mais limitada pela variável baixa temperatura. Além disso, o longo período das avaliações tende a

unificar os resultados, mesclando a eficiência imediata e real da amilase com a eficácia do processo fermentativo ao longo do tempo por outros fatores.

Por ser comum grande aumento de temperatura nos processos fermentativos no interior dos silos, não encontramos literatura avaliando atividade de amilases em realidade de temperaturas menores, sendo o esforço direcionado à preocupação com termoestabilidade em temperaturas mais elevadas. Assim, outros estudos poderão avaliar se a escolha de uma enzima com atividade em gradiente de temperatura menor que 33°C apresentará resultados diferentes dos alcançados.

Em relação à enzima pepsina, os dados do fabricante indicam que tolera temperaturas de até 40°C, e o resultado dos experimentos não apresentou temperaturas que pudessem desnaturá-la. Estudos demonstram que a proteólise ocorre em grande parte nos primeiros dois a cinco dias de fermentação (OHSHIMA E MCDONALD, 1978; MCKERSIE E BUCHANAN-SMITH, 1982; MUCK, 1987), e em temperaturas entre 15°C e 35°C a atividade das proteases é positivamente afetada (MUCK, 1988).

A adição de pepsina apresentou duas situações em relação à temperatura: (1) maior temperatura inicial em relação aos outros tratamentos (figura 1), provavelmente em consequência de maior degradação inicial das proteínas do milho e maior disponibilização de nutrientes para os agentes iniciais do processo fermentativo, e (2) redução da temperatura média interna dos silos ($P < 0,01$), possivelmente em razão de melhor perfil de fermentação do milho, disponibilizando maior quantidade de carboidratos solúveis para as bactérias do ácido láctico (ROTZ e MUCK, 1994). Contudo, as diferenças de temperatura foram pequenas e, apesar de significativas, é difícil interpretar seu impacto biológico nas características de fermentação da silagem, principalmente nos períodos mais longos. Isso porém pode ter resultado positivamente na degradabilidade do amido observada em todos os tempos de incubação ruminal e discutidos adiante.

5.2 pH

A técnica de ensilagem do grão moído e reidratado com 40% de umidade nesse estudo, com base no pH final, sugere que teores de umidade acima de 30% da matéria natural foram adequados (PEREIRA, 2011). O pH médio de 4,43 das silagens de milho moído e reidratado foi inferior ao encontrado por Hoffman et al. (2011) e Ferraretto et al. (2014) quando ensilou o milho grão úmido por 0, 15, 30, 60, 120 ou 240 dias e encontraram pH médio de 4,5. A diminuição no pH é esperada quando o milho grão de alta umidade é ensilado

por períodos maiores de 90 ou 165 dias (BARON et al., 1986; WARDYNSKI et al., 1993; MUCK, 2010; FERRARETTO et al., 2014), e pode ter sido influenciado pela utilização de inoculante e conseqüentemente sugestivo de boa fermentação bacteriana (MUCK, 2010; HOFFMAN, 2011) ou ao aumento das concentrações dos ácidos de fermentação, como o acetato (FERRARETTO, 2015) e lactato ao longo do tempo.

A amiloglucosidase utilizada atua com 80% de eficácia em pH 4,4 e 7,6 (ótimo de 5,6) segundo dados do fabricante e sua adição não interferiu nos resultados de pH da silagem.

Apesar de a pepsina ser estável e sofrer autólise lentamente em pH entre 2 e 6, sua faixa ótima de ação está entre pH 2,0 e 4,0. Em pH neutro e alcalino, sofre rápida e irreversível desnaturação. Nesse sentido uma queda de pH de forma mais acentuada pode ter possibilitado uma ação mais efetiva da pepsina adicionada. Apesar disso, sua adição reduziu significativamente a queda do pH, provavelmente pela ação de bactérias fixadoras de nitrogênio que sequestram os íons de hidrogênio para produção de NH_3 .

5.3 Nitrogênio Amoniacal (N-NH³)

Estudos demonstram que a proteólise eleva significativamente as concentrações e preservação de amônia no silo (MUCK, 1988). Os teores mais elevados de nitrogênio amoniacal (N-NH³) sugerem boa atividade proteolítica (HOFFMAN, 2011; FERRARETTO, 2014; Kung, 2014). Kung et al. (2014), ao avaliarem o efeito de uma protease exógena na silagem de milho de alta umidade, observaram que o tratamento do milho com protease diminuiu a concentração de prolaminas em 26 e 42%, após 70 e 140 dias de fermentação, respectivamente, e aumentou a concentração de nitrogênio amoniacal, resultado ratificado por Da Silva (2019).

A adição de pepsina aumentou a concentração de N-NH₃ possivelmente pela hidrólise das ligações peptídicas dos aminoácidos aromáticos na porção amino terminal, principalmente Fenilalanina-Phe e Tirosina-Tyr, além de Leucina-Leu que é apolar, e hidrofóbico (NELSON, 2014). Segundo Muscato *et al.* (1983), esses três juntos representam aproximadamente 23% do teor de aminoácidos nas frações não celulares e de parede celular dos grãos de milho.

Ainda nesse sentido, a pepsina catalisa também a hidrólise de ligações peptídicas de uma ampla gama de enzimas e cliva os sítios hidrofóbicos e os sítios de ligação entre: Fenilalanina-Valina, Glicina-Histidina, Glutamina-Alanina, Alanina-Leucina, Leucina-Tirosina, Fenilalanina-Tirosina, e Glicina-Fenilalanina (NIU, 2015; NIU, 2017). Isso passa a ser importante, pois a zeína é rica em Glutamato (21 a 26%), Leucina (20%), Alanina (10%) e

Fenilalanina (7%) (SHUKLA e CHERYAN, 2001). Tudo isso pode explicar, juntamente com maior atividade microbiana em função de maior acesso ao amido, o aumento do N-NH₃, e consequente redução da concentração de Zeína (HOFFMAN *et al.*, 2011; KUNG *et al.*, 2014).

5.4 Prolaminas – Zeína

As zeínas representam de 50 a 60% da proteína presente no grão de milho (HAMAKER *et al.*, 1995). Pesquisando a influência relativa que cada agente proteolítico representa durante o processo fermentativo na transformação da silagem, Junges (2017) descobriu que as bactérias são responsáveis por 60% da solubilização da proteína, enquanto enzimas do próprio grão 30%, fungos 5% e a fermentação de produtos finais mais 5%. Nesse sentido a pepsina adicionada à silagem contribuiu na degradação da matriz hidrofóbica, facilitando o acesso desses agentes aos nutrientes e consequentemente reduzindo os percentuais de zeína.

Em relação à ação de proteases, Kung (2014) identificou aumento na solubilidade proteica com redução importante dessas prolaminas em 26% e 42% aos 70 e 140 dias de fermentação, respectivamente. Já a adição de pepsina condiz com os estudos que confirmam a melhora na degradação da matriz proteica hidrofóbica do amido de milho através do pré-tratamento de alimentos com proteases exógenas (HOFFMAN *et al.*, 2011; YOUNG, 2012; KUNG, 2014).

Da Silva identificou que a prolongação do tempo de ensilagem também coincidiu com uma diminuição gradual ($P < 0,001$) na concentração de prolamina, enquanto Ferraretto (2015) conseguiu isolar os efeitos da adição de protease exógena e identificou melhoria na solubilidade da proteína ($P < 0,001$), mesmo em curtos períodos de ensilagem.

5.5 Degradabilidade Ruminal

Os maiores períodos de ensilagem coincidiram com maior degradabilidade em razão da prolongação do processo fermentativo, sendo os mesmos achados de Da Silva (2019) e Carvalho-Estrada (2020). O processo de ensilagem pode melhorar a fração rapidamente degradável do amido e a velocidade de degradação do mesmo no rúmen pela quebra da matriz proteica (JURJANS; MONTEILS, 2005; GRUBER, 2018). Ferraretto (2015) também identificou melhoria na digestibilidade *in vitro* do amido ($P < 0,03$) com o uso de proteases exógenas, mesmo em curtos períodos de ensilagem. Além disso, a adição de pepsina

confirmou a melhora na degradação da matriz proteica hidrofóbica do amido de milho, melhorando por consequência sua digestão pelas bactérias ruminais (HOFFMAN *et al.*, 2011; YOUNG, 2012; KUNG, 2014).

Para DePeters *et al.* (2006) o pré-tratamento de partículas de milho com protease aumentou a digestão ruminal de amido em milho moído às 16 horas de incubação *in vitro*. Nesse trabalho, a degradabilidade ruminal apresentou-se superior já nas 03 primeiras horas e foi superior em todas as medições (3h, 6h, 12h e 24h). Nesse mesmo sentido, Kung *et al.* (2014) identificou aumento na solubilidade proteica e aumento da digestibilidade ruminal *in vitro* do amido.

Desta forma, essa melhora na degradabilidade ruminal pode refletir em melhor eficiência alimentar ao animal e maior síntese de proteína microbiana no rúmen, visto que houve melhora na degradabilidade já nas primeiras três horas de incubação ruminal, justamente quando há pico de degradação proteica no rúmen. Sendo assim, animais alimentados com silagem de grão reidratado por 90 dias, pré-tratado com pepsina, poderão ter maior sincronismo ruminal entre nitrogênio e carboidrato (FERRARETO *et al.*, 2013).

A melhoria na degradabilidade ruminal já aos 15 dias de ensilagem para todos os tempos de incubação pode indicar redução no tempo de ação das proteases relatado por Kung *et al.* (2014), onde a protease exógena não reduziu a queda do pH nem aumentou o N-NH₃ em amostras frescas (d-0) de silagem de milho com alta humidade, observando melhorias apenas nos períodos de 70 e 140 dias de ensilagem. Outros estudos poderão indicar se a pepsina pode ter sido mais eficiente do que outras proteases exógenas que demandaram mais de 30 dias para afetar as concentrações de N-NH₃ no milho ensilado (FERRARETO, 2015). Gruber (2018) identificou que a comunidade bacteriana é diretamente afetada pelas condições dentro do silo, como velocidade de redução do pH, anaerobiose e período de armazenamento das silagens, observando também certa especificidade de flora bacteriana em silagem de milho grão reidratado. Aparentemente a pepsina possibilitou melhor desenvolvimento dessas espécies desejáveis, resultando em maior degradabilidade ruminal em todos os tempos de incubação.

Em resumo, a adição de pepsina reduziu a temperatura média interna dos silos, apresentou menor redução do pH, maximizou a degradação das proteínas hidrofóbicas logo aos 15 dias ensilagem, apresentou maior degradação ruminal do milho ensilado 90 dias em todos os tempos, e aumentou o teor de N-NH₃.

6. CONCLUSÃO

A utilização de pepsina mostrou-se eficiente na silagem de milho grão moído e reidratado, melhorando importantes aspectos nutricionais da silagem e de degradabilidade ruminal. Importante avaliar se a utilização de amilases com ação em gradientes de temperatura menores apresentariam comportamento diferente das encontradas nesse e em outros estudos.

7 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALLEN, M. S.; LONGUSKI, R. A.; YING, Y. Endosperm type of dry ground corn grain affects ruminal and total tract digestion of starch in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91 (E-Suppl.1):529 (Abstr.), 2008.

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

ANDRADE FILHO, R.; REIS, R. B.; PEREIRA, M. N.; SOUZA, R. F. Reconstituição, inoculação e ensilagem de grãos de milho maduros. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 47, 2010. Anais, Salvador, 2010.

ARCARI, M. A., MARTINS, C. M. DE M. R., TOMAZI, T., & SANTOS, M. V. DOS. (2016). Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(1), 60. doi:10.11606/issn.1678-4456.v53i1p60-71

ARTURO, S.R.A.; PEREIRA, M.N.; REIS, R.B.; PEREIRA, R.A.N. Effect of exogenous amylase on lactation performance of dairy cows fed a high-starch diet. *J. Dairy Sci.* v.101:1–9, 2018. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14331>

BARON, V. S.; STEVENSON, K. R.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 451- 461, 1986.

BENTON, J. R.; KLOPFENSTEIN, T.; ERICKSON, G. E. Effects of corn moisture and length of ensiling on dry matter digestibility and rumen degradable protein. *Nebraska Beef Cattle Rep.*, p. 31-33, 2005.

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

BITENCOURT, Luciene Lignani. Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho moído por milho hidratado e ensilado ou melaço de soja. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, cap. 2, p. 75, 2012.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Am. Soc. of Plant Physiol., Rockville, MD. 2000.

CAETANO M, GOULART RS, RIZZO PM, SILVA SL, DROUILLARD JS, LEME PR, LANNA DPD, Impact of flint corn processing method and dietary starch concentration on finishing performance of Nellore bulls, *Animal Feed Science and Technology* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.006>

CARVALHO-ESTRADA, P. DE A., FERNANDES, J., SILVA, É. B. DA, TIZIOTO, P., PAZIANI, S. DE F., DUARTE, A. P., ... NUSSIO, L. G. (2020). Effects of hybrid, kernel maturity, and storage period on the bacterial community in high-moisture and rehydrated corn grain silages. *Systematic and Applied Microbiology*, 126131. doi:10.1016/j.syapm.2020.126131

COLOMBATTO, D., MOULD, F. L., BHAT, M. K., PHIPPS, R. H., & OWEN, E. (2004). In vitro evaluation of fibrolytic enzymes as additives for maize (*Zea mays* L.) silage. *Animal Feed Science and Technology*, 111(1-4), 111–128. doi:10.1016/j.anifeedsci.2003.08.010

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos – v.7 – Safra 2019/20 – Primeiro levantamento, Brasília, p. 1-47 outubro 2019. Brasília: Conab, 2019. ISSN 2318-6852.

CORREA, C. E. S.; SHAVER, R. D.; PEREIRA, M. N.; LAUER J. G.; KOHN, K. Relationship between corn vitreousness and ruminal in situ starch degradability. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 3008-3012, 2002.

COTTA, M. A. Amylolytic of Selected Species of Ruminal Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 54, n. 3, p. 772-776, 1988.

CROCKER, L. M.; DEPETERS, E. J.; FADEL, J. G.; PEREZ-MONTI, H.; TAYLOR, S. J.; WYCKOFF, J. A.; ZINN, R. A. Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition. *Journal Dairy Science*. v. 81, p. 2394-2407, 1998.

DA SILVA, N.C.; NASCIMENTO, C.F.; CAMPOS, V.M.A.; ALVES, M.A.P.; RESENDE, F.D.; DANIEL, J.L.P.; SIQUEIRA, G.R. Influence of storage length and inoculation with *Lactobacillus buchneri* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of high-moisture corn and rehydrated corn grain silage, *Animal Feed Science and Technology*, Volume 251, 2019, Pages 124-133, ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.003>.

DEFOOR, P. J.; BROWN, M. S.; OWENS, F. N. Reconstitution of grain sorghum for ruminants. In: *CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM*, 1, 2006. Proceedings..., Oklahoma, p. 93-98, 2006.

DEPETERS, E. J; GETACHEW, G; FADEL, J. G; CORONA, L; ZINN, R. A. Influence of corn hybrid, protease and methods of processing on in vitro gas production. University of California, One Shields Avenue, Davis, CA 95616, USA. Department of Animal Science, p. 157-175, 2006.

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

ECKERT, C. T., FRIGO, E. P., ALBERECHT, L. P., ALBRECHT, A. J. P., CHRIST, D., SANTOS, W. G., ... EGEWARTH, V. A. (2018). Maize ethanol production in Brazil: Characteristics and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 3907–3912. doi:10.1016/j.rser.2017.10.082

EMBRAPA. EMBRAPA MILHO E SORGO. Sistema de Produção, 1 - Versão Eletrônica - 9ª edição. Nov/2015. ISSN 1679-012X 1. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeprod ucaolf6_1gal1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8668. Acessado em: 24/10/2019.

FAO. FOOD AN AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAOSTAT – Countries by commodity - 2019. Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acessado em 24/10/2019.

- FERRARETTO, L.F.; FREDIN, S.M.; SHAVER, R.D. Influence of ensiling, exogenous protease addition, and bacterial inoculation on fermentation profile, nitrogen fractions, and ruminal in vitro starch digestibility in rehydrated and high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* v.98:1–10, 2015. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-9891>
- FERRARETTO, L. F.; TAYSOM, K.; TAYSOM, D. M.; SHAVER, R. D.; HOFFMAN, P. C. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. *American Dairy Science Association. Journal of Dairy Science*, v. 97, p. 3221-3227, 2014.
- FLINT, H. J.; FORSBERG, C. W. Polysaccharide degradation in the rumen: biochemistry and genetics. In: ENGELHARDT, W. V., et al. (Eds). *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction. Proceedings of the Eighth International Symposium on Ruminant Physiology*, Stuttgart: Enke, p. 43-70, 1995.
- GIBBON, B.; LARKINS, B.A. Molecular genetic approaches to developing quality protein maize. *Trends in Genetics*, v. 4, p. 227-233, 2005.
- GÓMEZ, L. M.; POSADA, S. L.; OLIVERA, M. Starch in ruminant diets: a review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, v. 29, n. 2, p. 77-90, abril-junho de 2016.
- GOODRICH, R. D.; BYERS, F. M.; MEISKE, J. C. Influence of moisture content, processing and reconstitution on the fermentation of corn grain. *Journal of Animal Science*, v. 41, p. 876-881, 1975.
- GOUVÊA, V. N. Processamento de grãos de milho *flint* e sua substituição por polpa cítrica em dietas para tourinhos Nelore terminados em confinamento. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2012.
- GRANT, R. J. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: W. H. Miner Agricultural Research Institute Annual Tri-State Dairy Nutrition Conference, 14. Fort Wayne. *Proceedings. Fort Wayne.*, p. 73-79, 2005.
- GRUBER, L., TERLER, G., & KNAUS, W. (2018). Nutrient composition, ruminal degradability and whole tract digestibility of whole crop maize silage from nine current varieties. *Archives of Animal Nutrition*, 72(2), 121–137. doi:10.1080/1745039x.2018.1436665
- HALL, M. B. Determination of starch, including maltooligosaccharides, in animal feeds: Comparison of methods and a method recommended for AOAC collaborative study. *J. AOAC Int.* v. 92, p. 42-49, 2009.
- HAMAKER, B. R.; MOHAMED, A. A.; HABBEN, J. E.; HUANG, C. P.; LARKINS, B. A. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chemical*, v. 72, n. 6, p. 583-588, 1995.
- HILL, J.; LEAVER, J.D. Changes in chemical composition and nutritive value of urea treated whole crop wheat during exposure to air, *Animal Feed Science and Technology*, v. 102, Issues 1–4, 2002, p. 181-195, ISSN 0377-8401, [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(02\)00258-4](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(02)00258-4).
- HOFFMAN, P.C.; ESSER, N.M.; SHAVER, R.D.; COBLENTZ, W.K.; SCOTT, M.P.; BODNAR, A.L.; SCHMIDT, R.J.; CHARLEY, R.C. (2011) Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 94, I5, p. 2465–2474 (2011). doi: 10.3168/jds.2010-3562

HOFFMAN, P. C.; MERTENS, D. R.; LARSON, J.; COBLENTZ, W. K.; SHAVER R. D. A query for effective mean particle size of dry and high moisture corns. *Journal of Dairy Science*, v. 95, p. 3467-3477, 2012.

HOFFMAN, P. C.; SHAVER, R. D. The nutritional chemistry of dry and high moisture corn. In: ANNUAL SOUTHWEST NUTRITION AND MANAGEMENT CONFERENCE, 26, Arizona. Proceedings... Arizona: The University of Arizona Department of Animal Sciences, p. 12-23, 2011.

HUHTANEN, P.; SVEINBJÖRNSSON, J. Evaluation of methods for estimating starch digestibility and digestion kinetics in ruminants. *Animal Feed Sci Technol*; v. 130, p. 95-113, 2006.

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

JOBIM C. C.; BRANCO A. B.; SANTOS G. T. Silagem de grãos úmidos na alimentação de bovinos. In: V Simpósio Goiano sobre Manejo e Nutrição de Bovinos de Corte e Leite, Goiânia, p. 357-376, 2003.

JUNGES, D.; MORAIS, G.; SPOTO, M.H.F.; SANTOS, P.S.; ADESOGAN, A.T.; NUSSIO, L.G.; DANIEL, J.L.P. Short communication: Influence of various proteolytic sources during fermentation of reconstituted corn grain silages, *Journal of Dairy Science*, v. 100, Issue 11, 2017, p. 9048-9051, ISSN 0022-0302, <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12943>.

JURJANZ, S.; MONTELS, V. Ruminant degradability of corn forages depending on the processing method employed. *Anim. Res.*, v. 3, p. 15-23. 2005.

KHORASANI, G.R.; DE BOER, G.; ROBINSON, B.; KENNELLY, J.J. Influence of Dietary Protein and Starch on Production and Metabolic Responses of Dairy Cows, *Journal of Dairy Science*, Volume 77, Issue 3, 1994, Pages 813-824, ISSN 0022-0302, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77016-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77016-8).

KUNG JR L.; SHAVER, R. D.; GRANT, R. J.;SCHIMIDT, R. J. (2017) Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *J. Dairy Sci.* 101:4020–4033. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909> v.101, p. 4020-4033.

KUNG JR, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. *American Dairy Science Association. Dairy Science*, v. 97, p. 1707-1712, 2014.

LARSON, J.; HOFFMAN, P. C. A method to quantify prolamin proteins in corn that are negatively related to starch digestibility in ruminants. *Journal of Dairy Science*, n. 9, p. 4834-4839, 2008.

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

MATTHÉ, A.; LEBZIEN, P.; HRIC, I.; FLACHOWSKY, G.; SOMMER, A. Effect of starch application into the proximal duodenum of ruminants on starch digestibility in the small and total intestine. *Archives of Animal Nutrition*, v. 55, p. 351-369, 2001.

McALLISTER T. A.; RODE, L. M.; MAJOR, D. J.; CHUNG, K. J.; BUCHAMAN J. G. Effect of ruminal microbial colonization on cereal grain digestion. *Journal of Animal Science*, 70:571, 1990.

- McALLISTER, T. A.; PHILLIPE, R. C.; RODE, L. M.; CHENG, K. J. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, 71:205-212, 1993.
- McALLISTER, T. A.; GIBB, D. J.; BEAUCHEMIN, K. A.; WANG, Y. Starch type, structure and ruminal digestion. In: PIONEER HI-BRED, A DUPONT BUSINESS CONFERENCE. Jonston. Proceedings... Jonstons, p. 30-40, 2007.
- MCKERSIE, B.D.; BUCHANAN-SMITH, J. Changes in the levels of proteolytic enzymes in ensiled alfalfa forage. *Canadian Journal of Plant Science*. 1982. 62(1): 111-116. <https://doi.org/10.4141/cjps82-017>
- MELLO JÚNIOR, C. A. Processamento dos grãos de milho e sorgo visando aumento do valor nutritivo. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 4. Piracicaba, SP. Anais. Piracicaba, FEALQ. p. 263-283, 1991.
- MILLS, J. A. N.; FRANCE, J.; DIJKSTRA, J. A review of starch digestion in the lactating dairy cow and proposals for a mechanistic model. 1. Dietary starch characterisation and ruminal starch digestion. *J. Anim. Feed Sci.* v. 8, p. 291-340, 1999.
- MLADENović, D. S.; NIKOLIĆ, A.; KRAVIĆ, N.; SRDIĆ, J.; KOVAČEVIĆ, D.; ANDELKOVIĆ, V.; FILIPOVIĆ, M. Divergence among maize genotypes with different kernel types according to SSR marker analysis.- *Genetika*, 2019. Vol 51, No. 1, 237-249. <https://doi.org/10.2298/GENSR1901237N>
- MOHARRERY, A.; LARSEN, M.; WEISBJERG, M. R. Starch digestion in the rumen, small intestine, and hind gut of dairy cows. A metaanalysis. *Anim Feed Sci Technol.* v. 192, p. 1-14, 2014.
- MOMANY, F. A.; SESSA, D. J.; LAWTON., J. W.; SELLING, G. W.; HAMAKER, S. A. WILLET, J. L. Structural characterization of alpha-zein. *Journal of Agricultural Food Chemical*, cap. 54, p. 543-547, 2006.
- MOMBACH, M.A., PEREIRA, D.H., PINA, D.S., BOLSON, D.C, & PEDREIRA, B.C. (2019). Silage of rehydrated corn grain. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(3), 959-966. Epub June 14, 2019 .<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9676>
- MUCK, R. E.; DICKERSON, J. T. Storage temperature effects on proteolysis in alfalfa silage. *Trans. ASABE.*, n. 31, p. 1005-1009, 1988.
- MUCK, R. E. Dry Matter Level Effects on Alfalfa Silage Quality I. Nitrogen Transformations. *Trans. ASABE.*, n.30, 1987. <https://doi.org/10.13031/2013.30393>
47. MUCK, R.E. Silage microbiology and its control through additives. *R. Bras. Zootec.* vol.39 supl.spe Viçosa, 2010. ISSN 1806-9290. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300021>
- MUSCATO, T.V.; SNIFFEN, C.J.; KRISHNAMOORTHY, U.; VAN SOEST, P.J. Amino Acid Content of Noncell and Cell Wall Fractions in Feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, V.66, Issue 10, 1983, p. 2198-2207, ISSN 0022-0302, [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)82069-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)82069-4)
- MU-FORSTER, C.; B. P. WASSERMAN. Surface localization of zein storage proteins in starch granules from maize endosperm: Proteolytic removal by thermolysin and in vitro cross-linking of granule-associated polypeptides. *Plant Physiology.*, v. 116 p. 1563-1571, 1998.
- NELSON, D.L. *Lehninger principles of biochemistry*, 6th edition, 2014. ISBN 9781429234146.

NGONYAMO-MAJEE, D.; SHAVER, R. D.; COORS, J. G.; SAPIENZA, D.; LAUER, J. G. Relationship between kernel vitreousness and dry matter degradability for diverse corn germplasm. II. Ruminant and post-ruminant degradabilities. *Animal Feed Science and Technology*, v. 142, p. 259-274, 2008.

NIKOLIĆ, A; KRAVIĆ, N; SRDIĆ, J; KOVAČEVIĆ, D; ANĐELKOVIĆ, V; FILIPOVIĆ, M; MLADENOVIĆ-DRINIĆ, S. Divergence among maize genotypes with different kernel types according to SSR marker analysis. *Genetika* 2019 Volume 51, Issue 1, Pages: 237-249 <https://doi.org/10.2298/GENSR1901237N>.

NIU, C.; LUO, H.; SHI, P.; HUANG, H.; WANG, Y.; YANG, P.; YAO, B. N-Glycosylation Improves the Pepsin Resistance of Histidine Acid Phosphatase Phytases by Enhancing Their Stability at Acidic pHs and Reducing Pepsin's Accessibility to Its Cleavage Sites. *Appl Environ Microbiol.* 2016. V. 82(4): 1004–1014. doi:10.1128/AEM.02881-15

NIU, C.; YANG, P.; LUO, H.; HUANG, H.; WANG, Y.; YAO, B. Engineering the residual side chains of HAP phytases to improve their pepsin resistance and catalytic efficiency. *Sci Rep* 7, 42133, 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42133>

NOCEK J. E.; TAMMINGA S. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3598, 1991.

OFFNER, A.; BACH, A.; SAUVANT, D. Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol.*; v. 106, p. 81-93, 2003.

OLIVEIRA, E.R.; TAKIYA, C.S.; DEL VALLE, T.A.; RENNÓ, F.P.; GOES, R.H.T.B.; LEITE, R.S.R.; OLIVEIRA, K.M.P.; BATISTA, J.D.O.; ARAKI, H.M.C.; DAMIANI, J.; DA SILVA, M.S.J.; GANDRA, E.R.S.; PEREIRA, T.L.; GANDRA, J.R. Effects of exogenous amylolytic enzymes on fermentation, nutritive value, and in vivo digestibility of rehydrated corn silage, *Animal Feed Science and Technology*, Volume 251, 2019, p. 86-95, ISSN 0377-8401, <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.03.001>.

ØRSKOV, E., & MCDONALD, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *The Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499-503. doi:10.1017/S0021859600063048

ORTEGA, M. E.; MENDOZA, G. Starch digestion and glucose metabolism in the ruminant: a review. *Interciência*, v. 28, p. 380-386, 2003.

OHSHIMA, M.; MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds of herbage during ensilage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v.29, Issue 6, p. 497-505, 1978. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740290602>.

OWENS, F. N.; SODERLUND, S. Ruminant and post-ruminant starch digestion in cattle. In: PIONEER HI-BRED, A DUPONT BUSINESS CONFERENCE, Jonstons. Proceedings... Jonstons, p. 116-128, 2007.

OWENS, F.N.; ZINN, R.A.; KIM, Y.K. Limits to Starch Digestion in the Ruminant Small Intestine, *Journal of Animal Science*, Volume 63, Issue 5, November 1986, Pages 1634–1648, <https://doi.org/10.2527/jas1986.6351634x>

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. *Circular Técnica*, Embrapa, CNPMS, n. 75, p. 1-6, 2006.

PEREIRA, M. N. Milho reidratado e ensilado na alimentação de vacas leiteiras. Universidade Federal de Lavras, Departamento de Zootecnia. Minas Gerais. Junho de 2011.

- PEREIRA, M. N.; VON PINHO, R.G.; BRUNO, R.G.; CELESTINE, G.A. Ruminal degradability of hard or soft texture corn grain at three maturity stages. *Scientia Agricola*, v. 61, p. 358-363, 2004.
- PHILIPPEAU, C.; LANDRY, J.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. *Journal Science Food and Agricultural*, v. 80 p. 404-408, 2000.
- PHILIPPEAU, C., LE DESCHAULT DE MONREDON, F., MICHALETDOREAU, B. Relationship between ruminal starch degradation and the physical characteristics of corn grain. *Journal of Animal Science*, v. 77, p. 238-243, 1999.
- PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and ensiling of corn grain on in situ degradation of starch in the rumen. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 2178-2184, 1998.
- PHILIPPEAU, C.; MICHALET-DOREAU, B. Influence of genotype and stage of maturity of maize on rate of ruminal starch degradation. *Animal Feed Science and Technology*, v. 68, p. 25-35, 1997.
- PITT, R. E. (1990). *A Model of Cellulase and Amylase Additives in Silage*. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1788–1799. doi:10.3168/jds.s0022-0302(90)78859-5
- POND, W. G.; CHURCH, D. C.; POND, K. R. *Basic Animal Nutrition and Feeding*. 4^a Ed. New York: John Willey and Sons, p. 353-364, 1995.
- PRADYAWONG, S., JUNEJA, A., SADIQ, M., NOOMHORM, A., & SINGH, V. (2018). Comparison of Cassava Starch with Corn as a Feedstock for Bioethanol Production. *Energies*, 11(12), 3476. doi:10.3390/en11123476
- RABELO, C.H.S.; REZENDE, A.V.; NOGUEIRA, D.A.; RABELO, F.H.S.; SENEDESE, S.S.; VIEIRA, P.F.; BARBOSA, L.Á.; CARVALHO, A. Losses fermentative and aerobic stability of corn silages inoculated with lactic acid bacterial in different maturity stages. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, Salvador, v.13, n.3, p.656-668, 2012 <http://www.rbspa.ufba.br> ISSN 1519 9940
- REIS, R. A.; JOBIM, C. C.; RABELO, C. H. S. An overview about the role of silage inoculants in Brazil: a good strategy to improve the silage quality. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 52., 2015, Belo Horizonte. Anais... Brasília, SBZ, p.1-43, 2015.
- REIS, R. B.; MOURA A. M.; MALACCO V. M. R. Processamento de amido do concentrado para vacas em pastejo. In: III Simpósio Internacional em Formulação de Dietas para Gado Leiteiro. Universidade Federal de Lavras. Minas Gerais. p. 14, 27 de agosto de 2014.
- ROONEY, L. W.; PFLUGFELDER, R. L. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *Journal of Animal Science*, v. 63 p. 1607, 1986.
- ROTZ, C. A.; MUCK, R. E. Changes in forage quality during harvest and storage. In: FAHEY JR., G.C. Forage quality, evaluation, and utilization. Madison. American Society of Agronomy, p. 828-868, 1994.
- SAN EMETERIO, F.; REIS, R. B.; CAMPOS, E. W.; SATTER, L. D. Effect of fine grinding on utilization of dry or ensiled corn by lactating dairy cows. *Journal of Animal Science*, 83: 2839-2848, 2000.

SINGH, N., SINGH, S., SHEVKANI, K. (2019). Maize: Composition, Bioactive Constituents, and Unleavened Bread. Flour and Breads and Their Fortification in Health and Disease Prevention, 111–121. doi:10.1016/b978-0-12-814639-2.00009-5

SODERLUND, S.; OWENS, F. Corn hybrid by processing method considerations. In: CATTLE GRAIN PROCESSING SYMPOSIUM, 1, 2006. Proceedings..., Oklahoma, p. 62-72, 2006.

SHUKLA, R.; CHERYAN, M. Zein: the industrial protein from corn, *Industrial Crops and Products*. V. 13, Issue 3, 2001, p. 171-192. ISSN 0926-6690. [https://doi.org/10.1016/S0926-6690\(00\)00064-9](https://doi.org/10.1016/S0926-6690(00)00064-9)

SVIHUS, B.; UHLEN, A. K.; HARSTAD, O. M. Effect of starch granule structure, associated components and processing on nutritive value of cereal starch: A review. *Animal Feed Science, Technol*, 122: 303-320, 2005.

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

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

TONROY, B. R.; PERRY, T. W.; BEESON, W. M. Dry, ensiled high moisture, ensiled reconstituted high moisture and volatile fatty acid treated high moisture corn for growing finishing beef cattle. *Journal of Animal Science*, v. 39, p. 931-936, 1974.

UNIACKE-LOWE, T.; FOX, P. F. Chapter 4 - Chymosin, Pepsins and Other Aspartyl Proteinases: Structures, Functions, Catalytic Mechanism and Milk-Clotting Properties, Editor(s): Paul L.H. McSweeney, Patrick F. Fox, Paul D. Cotter, David W. Everett, *Cheese (Fourth Edition)*, Academic Press, 2017, Pages 69-113, ISBN 9780124170124, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417012-4.00004-1>

VAN SOEST, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2. ed. Cornell University Press. Ithaca., p. 476, 1994.

VANIER, N. L., VAMADEVAN, V., BRUNI, G. P., FERREIRA, C. D., PINTO, V. Z., SEETHARAMAN, K., ... BERRIOS, J. D. J. (2016). Extrusion of Rice, Bean and Corn Starches: Extrudate Structure and Molecular Changes in Amylose and Amylopectin. *Journal of Food Science*, 81(12), E2932–E2938. doi:10.1111/1750-3841.13545

WANG, P.; JOHNSON, D. B.; RAUSCH, K. D.; SCHMIDT, S. J.; TUMBLESON, M. E.; SINGH, V. Effects of protease and urea on a granular starch hydrolyzing process for corn ethanol production. *Cereal Chemical*, 86: p. 319-322, 2009.

WANG, T. L.; BOGRACHEVA, T. Y.; HEDLEY, C. L. Starch: as simple as A, B, C?. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 49, p. 481-502, 1998.

WARDYNSKI, F.A.; RUST, S.R.; YOKOYAMA, M.T. Effect of microbial inoculation of high-moisture corn on fermentation characteristics, aerobic stability, and cattle performance, *Journal of Animal Science*, Volume 71, Issue 8, August 1993, Pages 2246–2252, <https://doi.org/10.2527/1993.7182246x>

YOUNG, K. M.; LIM, J. M.; DER BEDROSIAN, M. C.; KUNG JR, L. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. American Dairy Science Association. *Journal of Dairy Science*. v. 95, p. 6687–6694, 2012.

ZHAO, F., REN, W., ZHANG, A., JIANG, N., LIU, W., & WANG, F. (2018). Effects of different amylose to amylopectin ratios on rumen fermentation and development in fattening lambs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 31(10), 1611–1618. doi:10.5713/ajas.17.0833

ZHOU, Y.; DROUIN, P.; LAFRENIERE, C. Effect of temperature (5–25°C) on epiphytic lactic acid bacteria populations and fermentation of whole-plant corn silage. *Journal of Applied Microbiology* Volume 121, Issue 3, 2016. <https://doi.org/10.1111/jam.13198>