



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

CELSO HEINZEN JUNIOR

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A  
QUALIDADE NUTRICIONAL DE SILAGEM DE GRÃOS DE  
MILHO HIDRATADOS**

---

Londrina  
2018

**CELSO HEINZEN JUNIOR**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A  
QUALIDADE NUTRICIONAL DE SILAGEM DE GRÃOS DE  
MILHO HIDRATADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Valter Harry Bumbieris Junior

Coorientadora: Profa. Dra. Odimari Pricila Prado Calixto

Londrina  
2018

Heinzen Junior, Celso.

EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE NUTRICIONAL DE SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO HIDRATADOS / Celso Heinzen Junior. - Londrina, 2018. 72 f. : il.

Orientador: Valter Harry Bumbieris Junior.

Coorientador: Odimari Pricila Prado Calixto.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2018. Inclui bibliografia.

1. Qualidade nutricional de silagens de grãos de milho hidratados - Tese. 2. Cinética de degradabilidade de dietas contendo silagens de grãos de milho hidratados - Tese. 3. Microscopia eletrônica de varredura de estrutura do endosperma de silagens de grãos de milho hidratados - Tese. I. Bumbieris Junior, Valter Harry. II. Prado Calixto, Odimari Pricila. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

**CELSO HEINZEN JUNIOR**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE  
NUTRICIONAL DE SILAGEM DE GRÃOS DE MILHO HIDRATADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Valter Harry Bumbieris Junior  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Thais de Souza Rocha  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Dr. Rodrigo da Costa Gomes  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -  
EMBRAPA

Londrina, 31 de janeiro de 2018.

A Deus, aos meus familiares, minha namorada  
Andressa Crescêncio e a todos meus amigos que  
acreditaram e me apoiaram, dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao meu orientador Valter Harry Bumbieris Junior por toda a dedicação, atenção, paciência e amizade durante todo esse período.

Agradeço a professora doutora Odimari Pricila Prado Calixto pelo apoio na realização desse trabalho.

Agradeço aos professores Admilton Gonçalves de Oliveira Junior e Thais de Souza Rocha pela prontificação em ajudar nas análises laboratoriais.

Agradeço a Tania, técnica do laboratório de nutrição animal do departamento de zootecnia pela ajuda e paciência.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa cedida.

Agradeço a equipe da Central Multiusuária de Laboratórios de Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina pela ajuda no trabalho conduzido.

Agradeço a SLO<sup>®</sup> Agropecuária por ceder o aditivo utilizado nesse estudo.

Agradeço aos meus amigos de pós-graduação pela companhia e ajuda em todo esse período.

Agradeço minha mãe Maria de Lourdes Carvalho Heinzen e minha irmã Ana Maria Carvalho Heinzen que sempre esteve do meu lado, me apoiando e me ensinando a ser um homem digno.

Agradeço minha namorada Andressa Crescêncio que sempre foi meu alicerce e minha inspiração.

Agradeço meus amigos de longa data Ruan Firmano, Carlos Henrique Milhate, Luiz Gustavo Manoel, Fernando Valone Melo, Alessandro Gameiro, Cayo Augusto Catelli, Raúl Nobrega, Ricardo Lourenço e Okssana Ageran por todo o apoio e amizade durante todos esses anos.

Meu muito obrigado!

“De Deus nós sabemos que existe, que é a causa de todos os seres e que é infinitamente superior a tudo. Isto é a conclusão e o ponto culminante do nosso saber nessa vida terrena.”  
Santo Tomás de Aquino

HEINZEN JUNIOR, Celso. **Efeito do tempo de armazenamento sobre a qualidade nutricional de silagem de grãos de milho hidratados**. 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

## RESUMO

Produzir leite e carne provenientes dos ruminantes é uma atividade que requer, principalmente, uma boa nutrição dos animais e uma boa qualidade dos alimentos oferecidos à eles. O amido do milho é a maior fonte de energia para animais de alta produção, e para melhorar a eficiência do uso desse amido pelos animais é necessário que seja de boa digestibilidade, que pode variar de acordo com seu tipo de endosperma, grau de processamento e tempo de ensilagem. A técnica de hidratação e ensilagem do milho maduro pode trazer vantagens quanto ao preço e a qualidade desse alimento oferecido aos animais. Objetivou-se então, avaliar a influência do tempo de armazenamento sobre a qualidade nutricional de silagens de grãos de milho hidratados com a utilização ou não de aditivo enzimo-microbiano. O estudo foi desenvolvido na Fazenda Escola e no Laboratório de Nutrição Animal da Universidade Estadual de Londrina. Foram conduzidos experimentos para avaliar a qualidade fermentativa e a modificação da estrutura do endosperma pelos ácidos e enzimas produzidos durante a fermentação das silagens em diferentes tempos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias) com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano. Foram gerados parâmetros da cinética de degradabilidade ruminal de carboidratos de dietas formuladas para vacas em lactação contendo a silagem de grãos de milho hidratados em diferentes tempos de armazenamento. Posteriormente os parâmetros de cinética de degradação das dietas com silagem de grãos hidratados foram comparados com dietas contendo milho moído. Houve modificação na estrutura e degradação do amido e das prolaminas que envolvem os grânulos, com acentuação nas silagens inoculadas com aditivo enzimo-microbiano, sendo que essas alterações contribuíram para que houvesse aumento na degradação ruminal dos carboidratos fibrosos e não fibrosos das dietas incubadas. Nas dietas contendo silagens com aditivo, o tempo de colonização apresentou comportamento quadrático com estabilização próximo ao noventa dias de armazenamento. O tempo de colonização foi reduzido para silagens em comparação ao milho moído. As taxas de degradação dos carboidratos fibrosos e não fibrosos aumentaram em relação ao milho moído, porém o volume total de gases produzidos pelos carboidratos fibrosos e não fibrosos foi inferior. Conclui-se que o aditivo enzimo-microbiano pode ser utilizado na ensilagem de grãos de milho hidratados e que o maior tempo de armazenamento das silagens pode alterar a estrutura do endosperma e proporcionar melhora na qualidade nutricional do alimento.

**Palavras-chave:** Amido. Armazenamento. Fermentação. Silagem de grãos hidratados.

HEINZEN JUNIOR, Celso. **Effect of storage time on the nutritional silage quality of hydrated corn grains**. 2018. 72 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

### ABSTRACT

Producing milk and meat from ruminants is an activity that requires, mainly, good nutrition of the animals and a good quality of the food offered to them. Corn starch is the major source of energy for high production animals, and to improve the efficiency in the use of starch by the animals it is necessary to have a good digestibility, which may vary according to type of endosperm, degree of processing and storage time. The technique of hydration and ensilage of mature corn can bring advantages as to the price and quality of this food offered to the animals. The objective of this study was to evaluate the influence of storage time on the nutritional quality of hydrated corn grain silages. The experiments were carried out to evaluate the fermentative quality and the modification of the structure of the starch granules by the acids produced during the fermentation of the silages in different storage times (30, 60, 90 and 120 days) with and without the use of microbial enzyme additive. The rumen carbohydrates degradability kinetics of diets formulated for lactating cows containing the hydrated corn grain silage were generated. Subsequently the kinetic parameters of the degradation of the diets with silage of hydrated grains were compared with diets containing ground corn. There was a change in the structure and degradation of the starch and the prolamins that surround the granules, with emphasis when the silage was inoculated with an enzyme-microbial additive. These changes contributed to increase ruminal degradation of the fibrous and non-fibrous carbohydrates of the incubated diets. Diets containing silages with additive, the lag time presented quadratic curve with stabilization near ninety days of storage. Lag time was reduced for silages compared to ground corn. The rates of degradation of fibrous and non-fibrous carbohydrates increased in relation to ground corn, but the total volume of gases produced by fibrous and non-fibrous carbohydrates was lower. The enzyme-microbial additive can be used in the ensiling of hydrated corn grains and that the longer storage time of the silages can alter the structure of the endosperm and provide an improvement in the nutritional quality of the food.

**Key words:** Corn grain hydrated silage. Fermentation. Starch. Storage time.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** – Estrutura da amilose e da amilopectina ..... 17

### Artigo

**Figura 1** – Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e capacidade tampão (CT) de silagens de grãos de milho hidratados ..... 39

**Figura 2** – Teores de lignina insolúvel em detergente ácido de silagens de grãos de milho hidratados ..... 41

**Figura 3** – Concentração de açúcar redutor em silagens de grãos de milho hidratados ..... 42

**Figura 4** – Tempo de colonização de silagens de grãos de milho hidratados ensilados com e sem aditivo enzimo-microbiano ..... 46

**Figura 5** – Microscopia eletrônica de varredura de silagens de grãos de milho hidratados ..... 50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> –	Características bromatológicas das silagens de grãos de milho hidratados ensilados com e sem aditivo enzimo-microbiano .....	35
<b>Tabela 2</b> –	Composição centesimal e composição química das dietas incubadas para análise da cinética de degradabilidade ruminal.....	36
<b>Tabela 3</b> –	Parâmetros da cinética de degradação dos carboidratos em dietas incubadas com silagem de grãos de milho hidratados com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano e em diferentes tempos de armazenamento. ....	44
<b>Tabela 4</b> –	Parâmetros da cinética de degradação dos carboidratos em dietas incubadas contendo milho moído (MM) e silagens de grãos de milho hidratados com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano (SGH e SGHA) em diferentes tempos de armazenamento .....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SGH	Silagem de grãos de milho hidratados sem uso de aditivo
SGHA	Silagem de grãos de milho hidratados com inoculação de aditivo
MS	Matéria seca
MO	Matéria orgânica
PB	Proteína bruta
EE	Extrato etéreo
MM	Matéria mineral
FDN	Fibra detergente neutro
FDN <sub>pc</sub>	Fibra detergente neutro corrigido para proteína e cinzas
FDA	Fibra detergente ácido
LDA	Lignina insolúvel em detergente ácido
HEM	Hemicelulose
LIG	Lignina
CF	Carboidratos fibrosos
CHOT	Carboidratos totais
CNF	Carboidratos não fibrosos
AGV	Ácidos graxo volátil
MV	Matéria verde
VCF	Volume final de produção de gases dos carboidratos fibrosos
kdCF	Taxa de degradação dos carboidratos fibrosos
VCNF	Volume final de produção de gases dos carboidratos não fibrosos
kdCNF	Taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos
L	Lag time ou tempo de colonização
V <sub>final</sub>	Volume final de gases produzidos
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
BAL	Bactéria ácido láctica
BAL <sub>ho</sub>	Bactéria ácido láctica homofermentativa
AOAC	Association of Official Analytical Chemists

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	15
2.1	SILAGEM DE GRÃOS REIDRATADOS .....	15
2.2	TEMPO DE ARMAZENAMENTO .....	16
2.3	AMIDO E PROLAMINAS .....	16
2.4	FERMENTAÇÃO RUMINAL DO AMIDO.....	19
2.5	ADITIVOS DE ENSILAGEM.....	20
2.6	DEGRADABILIDADE IN VITRO DOS CARBOIDRATOS .....	22
2.7	AÇÚCARES REDUTORES NOS CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIIS .....	23
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b>	
	<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	32
	<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
	2.1 <i>Análises bromatológicas</i> .....	34
	2.2 <i>Determinação de pH, N-amoniacal e Capacidade tampão</i> .....	35
	2.3 <i>Determinação de açúcares redutores</i> .....	35
	2.4 <i>Microscopia eletrônica de varredura da estrutura dos grânulos de amido</i> .....	35
	2.5 <i>Cinética de degradabilidade ruminal dos carboidratos de dietas contendo silagem de grãos de milho hidratados</i> .....	35
	2.6 <i>Estatística</i> .....	38
	<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	38
	<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	51
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	52
	<b>ANEXOS</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

A nutrição de ruminantes e produção de alimentos com qualidade são os dois maiores desafios na busca por uma produção eficiente, tanto de carne como de leite. Nesse contexto se encaixa a dificuldade dos animais em consumirem a energia necessária para manifestarem altas produtividades, visto que o consumo de matéria seca é regulado por fatores inerentes aos animais e aos alimentos (SILVA, 2011). Para isso é necessário que os alimentos oferecidos aos animais apresentem boa digestibilidade dos nutrientes, aportando assim maior quantidade de energia ao organismo.

Muitas vezes, a maior parte da energia fornecida às vacas em lactação e animais em engorda de alta produção é proveniente do amido de milho, seja o grão seco processado, a silagem de grãos úmidos ou a silagem da planta inteira. A digestibilidade desse amido pode variar com: o tipo de endosperma (LOPES et al., 2009), seu grau de processamento (FERRARETTO et al., 2013) e o tempo de ensilagem (PHILIPPEAU & MICHALET-DOREAU, 1998).

A ensilagem de grãos hidratados é um processo que pode ser executado pelo produtor, tornando-o mais atuante sobre o custo final do alimento, que se baseia na hidratação do grão maduro para favorecer a fermentação e o armazenamento como silagem. Esse processo pode proporcionar vantagens tanto no aumento da digestibilidade do amido como no operacional, diminuindo custos com armazenamento e transporte de grãos para silos comerciais graneleiros e podendo diminuir perdas nessas operações (PEREIRA, 2013).

A maior digestibilidade do amido traz como benefício o maior aporte de energia e o melhor aproveitamento do nitrogênio da dieta pela síntese de proteína microbiana (VAN SOEST, 1994) aumentando também a concentração de proteína do leite (REYNOLDS et al., 1997). Outra vantagem seria o aumento de produção de leite para dietas com maior nível de digestibilidade ruminal e total do amido (CROCKER et al., 1998).

No Brasil, a maioria dos híbridos de milho utilizados apresentam endosperma com maior proporção vítrea, ou seja, os grânulos de amido são helicoidais e adensados (DAVIDE, 2009), ainda, esses grânulos são envoltos por proteínas de características hidrofóbicas (prolaminas), que no milho são denominadas como zeínas, sendo de baixa solubilidade no fluido ruminal (PEREIRA, 2013), o que confere menor acesso das bactérias ruminais ao amido.

A ação de ácidos resultantes da fermentação anaeróbica podem solubilizar as zeínas, facilitando o acesso de enzimas microbianas e sua proteólise (BARON et al., 1986).

Após a estabilização da fermentação esses ácidos e enzimas continuam agindo sobre as zeínas tornando essas proteínas mais desorganizadas (THEURER et al.,1999), o que facilita a ação das bactérias ruminais ao amido. Portanto, longos períodos de fermentação podem aumentar a degradabilidade ruminal do amido, melhorando assim o desempenho animal.

A utilização de aditivos para ensilagem de grãos é bem difundida entre os produtores, com o objetivo de melhorar a qualidade fermentativa das silagens e evitar perdas (KUNG JR. et al., 2003). Alguns aditivos contém enzimas que podem ter papel importante sobre os componentes dos grãos, sendo então uma alternativa para melhorar a qualidade nutricional das silagens inoculadas com esse tipo de aditivo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SILAGEM DE GRÃOS HIDRATADOS

O grão de milho é o alimento mais utilizado como fonte de energia para animais de alta produção. Sua alta concentração de amido de boa digestibilidade, além do preço acessível para os produtores, denotam essa acentuada utilização na alimentação dos ruminantes.

O problema está no armazenamento do grão de milho, visto que vários fatores como a secagem; temperatura; umidade relativa do ar; ataques de insetos, roedores, pássaros e outros animais; danificações mecânicas e outras alterações químicas e bioquímicas (SANTOS, 2004) e também ataque por microrganismos indesejáveis, podem tornar o alimento inutilizável para consumo ou para industrialização. A qualidade do grão e principalmente o sistema de armazenamento podem diminuir ou até impedir a ocorrência de fatores deteriorantes (PIMENTEL E FONSECA, 2012).

A ensilagem do grão de milho é um processo executável na propriedade e proporciona ao produtor a facilidade de armazenamento do alimento (PEREIRA, 2013). O grão colhido e seco, que pode ser comprado pelo produtor em épocas de baixo preço, é hidratado para que o alimento contenha em torno de 35 a 40% de umidade e assim adquira atividade de água necessária para fermentação.

Após a hidratação, compactação e vedação do material, se inicia a fermentação realizada por microrganismos da fauna epifítica da planta a partir dos carboidratos solúveis contidos no grão produzindo ácidos orgânicos, principalmente ácido lático. Esses ácidos liberam hidrogênio para o meio reduzindo o pH e então conservando o alimento além de evitar fermentações indesejáveis como a realizada por bactérias do gênero *clostridium* (McDONALD et al., 2010).

O uso dessa tecnologia foi iniciado e disseminado por pesquisadores da Universidade Federal de Lavras – Lavras (MG) caracterizada como uma alternativa ao uso de silagem de grãos úmidos de milho. Apesar de seu uso na alimentação de ruminantes ocorrer comumente, ainda há grande lacuna de informações a serem respondidas pela pesquisa.

Segundo Theurer (1986), o aproveitamento do amido pelo animal depende do processamento em que o grão é submetido e que o melhor aproveitamento é fundamental para melhorar a eficiência produtiva dos animais.

## 2.2 TEMPO DE ARMAZENAMENTO

No Brasil muito se discute o desenvolvimento de técnicas de diminuição do tempo para completa fermentação das silagens, com o objetivo de obter um alimento conservado de qualidade em pouco tempo, em resposta ao mal planejamento alimentar ou a falta repentina de alimentos para o rebanho em propriedades rurais por todo o território nacional.

Por outro lado, em propriedades onde o planejamento e a alimentação do rebanho não são problemas urgentes e recorrentes, o que acontece é o oposto da situação supracitada. Então, por meio de boas perspectivas relatadas advindas de produtores que utilizavam silagens há muito tempo conservadas, é que a pesquisa para entender o que ocorre após a estabilização da fermentação láctica em silagens se desenvolveu, tornando então o uso do tempo de armazenamento como ferramenta para possíveis acréscimos na qualidade do alimento conservado.

Estudos sobre o tempo de armazenamento, apresentaram impacto para silagens americanas de grãos de milho úmido, já que silagens com longo período de armazenamento proporcionavam melhor aproveitamento do amido (HOFFMAN et al., 2011; FERRARETO et al., 2013; KUNG Jr. et al., 2014), tornando então uma prática recomendável para silagens de grãos úmidos.

No Brasil, com o desenvolvimento da técnica de hidratação de grãos de milho para ensilagem, pesquisadores afirmam que mesmo com o amadurecimento do grão há ganho na digestibilidade quando o alimento é ensilado por longos períodos (BITENCOURT, 2012; ARCARI et al., 2016). A técnica de hidratação de grãos de milho aliada a longos períodos de armazenamento, portanto, expõe uma estratégia interessante no aspecto da conservação e do valor nutritivo para silagens de grãos de milho.

## 2.3 AMIDO E PROLAMINAS

O amido é um carboidrato não fibroso (CNF) assim como outros açúcares, pois estão localizados no conteúdo celular da planta (ANTUNES et al., 2011). É um polímero de glicose sintetizado pelas plantas com função energética em períodos de dormência, germinação dos grãos, rebrota e crescimento (WANG et al., 1998).

Ainda segundo Wang et al. (1998), o amido é formado por dois diferentes tipos de polímeros de glicose: a amilopectina e a amilose. De acordo com Antunes et al. 2011, a amilose é um polímero longo e linear com 99% dos resíduos de glicose ligados por alfa-1,4

e 1% dos resíduos ligados por alfa-1,6 (Figura 1 – A), com peso molecular que varia entre  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  (TESTER et al., 2004). Já a amilopectina é uma estrutura com muitas ramificações, apresentando aproximadamente 95% dos resíduos com ligações alfa-1,4 e 5% com ligações alfa-1,6 (Figura 1 – B). As cadeias ramificadas são responsáveis pelo empacotamento complexo dos resíduos de glicose nos grânulos de amido (BALL et al., 1998) com peso molecular entre  $1 \times 10^7$  a  $1 \times 10^9$  (TESTER et al., 2004).

A partir da relação amilose:amilopectina pode-se classificar os amidos como cerosos (amilose menor que 15%), normais (20 a 35% de amilose) e de alta amilose (amilose superior a 40%) (TESTER et al., 2004).

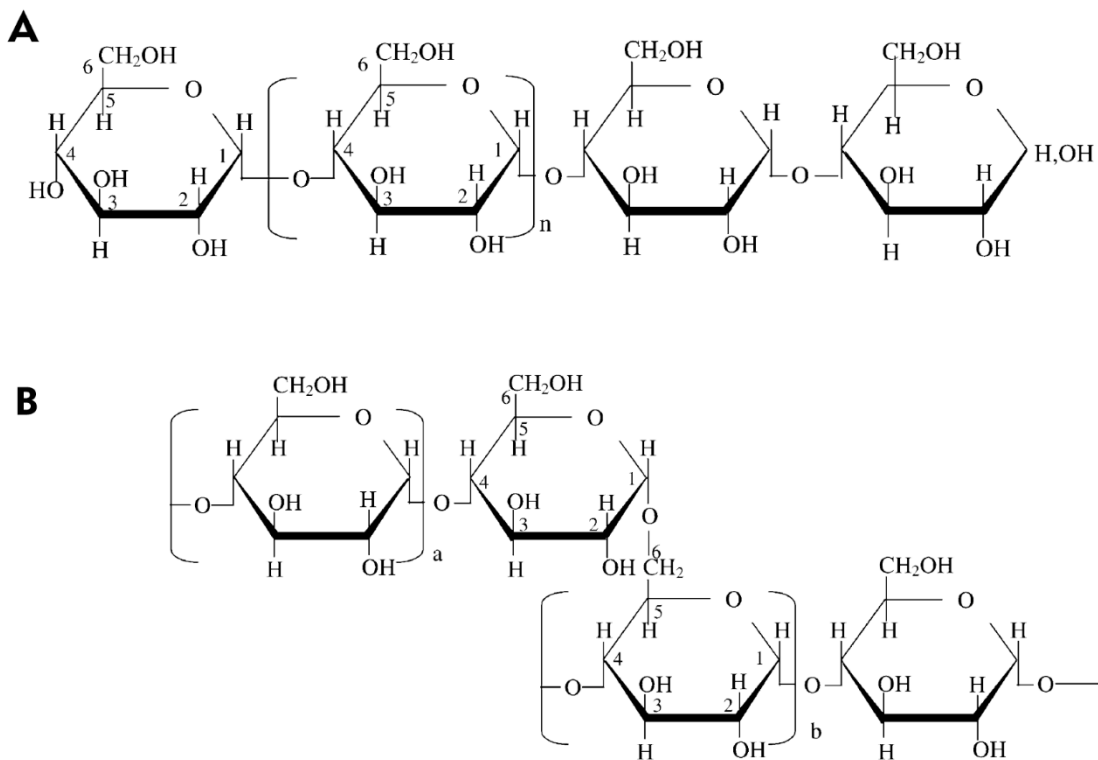


Figura 1 – Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B). A amilose é um polímero de glicose não ramificado com ligações  $\alpha$ -1,4. A amilopectina possui muitas ramificações, com ligações  $\alpha$ -1,6.

Fonte: adaptado de Tester et al. (2004).

A amilose e a amilopectina formam grânulos de amido que apresentam diferentes organizações cristalizadas (com maiores teores de amilopectina) ou amorfas (com maiores teores de amilose) em locais diferentes do próprio grânulo (WANG et al., 1998). Essa

característica torna os grânulos mais ou menos susceptível à hidratação e em consequência à adesão e à fermentação pelas bactérias ruminais.

Os grânulos de amido são depositados no interior do endosperma e sua forma (redondo ou poligonal), associação (simples ou compostos) e distribuição de tamanho da partícula (uni ou bimodal) variam de acordo com o tipo de grão (TESTER et al., 2004).

Além disso, o grânulo é envolto por uma matriz proteica composta por prolaminas (conhecidas como zeínas para o milho), proteínas solúveis em álcool contendo agentes redutores que representam em torno de 50% da proteína total do grão, porém são pobres em aminoácidos importantes como o triptofano e a lisina, o que explica a baixa qualidade proteica do grão de milho (PAIVA et al., 1991).

As zeínas podem ser divididas em várias classes que se diferem principalmente pelo seu tamanho e estrutura:  $\alpha$ -zeína (a maior e mais presente classe),  $\beta$ -zeína,  $\gamma$ -zeína e  $\delta$ -zeína (PRATT et al., 1995). Essas proteínas são a essencial diferença entre grãos de endosperma de maior proporção vítrea, comumente chamados de grãos duros, e grãos dentados, contendo nesse último, maiores proporções de endosperma farináceo onde os grânulos de amido são maiores e menos agregados na matriz proteica formada pelas zeínas.

Paiva et al. (1991), descreveram a distribuição das zeínas nos diferentes tipos de endosperma em diferentes genótipos de milho e descobriram que em endospermas duros, há uma maior concentração de zeínas de todos os tipos, independente do genótipo. Geralmente em endospermas duros há maior presença de  $\alpha$ -zeína e em endospermas farináceos, maior presença de  $\gamma$ -zeína (WALLACE et al., 1990), sugerindo relação negativa entre a dureza do endosperma e a quantidade de zeínas do tipo  $\gamma$  no mesmo endosperma, para genótipos convencionais (PRATT et al., 1995).

Essa matriz proteica de característica hidrofóbica, se torna uma barreira físico-química na digestão de amido pelos ruminantes (OWENS et al., 1986), visto que as bactérias amilolíticas normalmente dependem da adesão ao amido para sua digestão (VALADARES FILHO E PINA, 2011), além de que muitas espécies que digerem amido são incapazes de digerir a matriz proteica (ANTUNES et al., 2011).

O parâmetro de nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) é descrito como produto exclusivo da deaminação de proteínas segundo Ohshima e McDonald (1978). Hoffman et al. (2011) e Arcari et al. (2016), observaram aumento significativo dos teores de nitrogênio amoniacal de silagens de grãos úmidos e hidratados de milho ao longo do tempo de armazenagem, sugerindo a ocorrência da degradação de proteínas dos grãos pela ação bacteriana. Ferrareto et al. (2014), em um estudo com mais de 6 mil amostras de silagem de

grãos de milho úmido relacionaram, de forma direta e positiva, maiores teores de N-NH<sub>3</sub> com o aumento da degradabilidade ruminal do amido dessas silagens, o que sugere a maior exposição do substrato à fermentação ruminal.

#### 2.4 FERMENTAÇÃO RUMINAL DO AMIDO

A fermentação do amido no rúmen gera principalmente ácido propiônico, um ácido graxo de cadeia curta importantíssimo para o metabolismo energético do animal. Com a absorção de ácido propiônico, o animal consegue metabolizar esse composto em glicose no fígado, por meio da gliconeogênese. Esse mecanismo se torna importante para a manutenção da glicemia ao passo que a absorção de glicose nos compartimentos pós-ruminais é baixa (REYNOLDS et al., 1994). Além disso, a glicose é um precursor da lactose nas células epiteliais que envolvem os alvéolos da glândula mamária, portanto o maior aporte de glicose na glândula afeta o metabolismo de lactose, principal componente osmótico do leite, podendo aumentar a produção de leite.

Aumentar a degradação ruminal do amido, por meio da ensilagem, pode ocasionar melhor desempenho dos animais capaz de compensar o custo de ensilagem (PEREIRA et al., 2013). Quando o material é ensilado, ácidos e enzimas provenientes de microrganismos fermentadores durante o armazenamento agem sobre as zeínas tornando essas proteínas, que envolvem o amido, mais desorganizadas (THEURER et al., 1999).

Ainda segundo Theurer et al. (1999), quando o amido se torna mais disponível à fermentação ruminal, as bactérias são mais eficientes na utilização do nitrogênio do rúmen devido ao maior aporte de energia, o que gera uma maior produção de proteína microbiana, já que a sincronia entre esses nutrientes é fator importante no desenvolvimento bacteriano.

Além disso, a maior degradabilidade do amido no rúmen está correlacionada com a maior digestibilidade total do amido, visto a menor eficiência de digestão e absorção do nutriente no intestino delgado, possivelmente pela atividade limitada da amilase, isomaltase e maltase intestinal e pela baixa secreção dessas enzimas e ainda pela limitação na absorção de glicose (ANTUNES et al., 2011).

Owens et al. (1986), em revisão de mais de 40 trabalhos, observaram significativo aumento da degradabilidade ruminal do amido de milho seco (58,9% do amido dietético) para o milho ensilado (86%), aumentando conseqüentemente a digestibilidade total que foi de 91,7% para 94,6% respectivamente. Ainda observaram maior potencial de

degradação ruminal do milho ensilado em relação ao milho floculado (82,8%), um dos métodos mais caros de processamento do milho.

Dietas contendo altas concentrações de proteína degradável no rúmen são capazes de produzir altas concentrações de amônia, sendo então necessário, ao mesmo tempo, carboidratos rapidamente degradáveis fornecendo esqueletos de carbonos para a utilização do nitrogênio liberado na construção de proteína microbiana (MARTINS et al., 1999). Ainda segundo Martins et al. (1999) esse parâmetro se torna importante na formulação de dietas, visto que os consideráveis sistemas de exigências nutricionais, como por exemplo o americano National Research Council – NRC, calculam exigências proteicas em termos de proteína metabolizável que é proveniente dos aminoácidos absorvidos no intestino delgado.

Então, para uma formulação atender exigências altas de produção, é necessário que os alimentos contidos na dieta oferecida ao animal seja de boa degradabilidade, o que proporciona ao ambiente ruminal sinergismo entre energia e proteína responsável pelo aumento da síntese de proteína microbiana e conseqüentemente maior degradação dos nutrientes (MAENG e BALDWIN, 1976).

## 2.5 ADITIVOS DE ENSILAGEM

A fermentação de um alimento visa alcançar produção de ácido láctico em quantidades suficientes para inibir o crescimento de microrganismos indesejáveis e o metabolismo da planta (BOLSEN et al., 1992), conservando assim, o alimento.

Alimentos considerados ideais para ensilagem devem possuir algumas características importantes como baixa capacidade tamponante, altos teores de açúcares solúveis, umidade adequada e fauna epifítica que favoreça a produção de ácido láctico para melhor conservação do material ensilado. Entretanto, algumas dessas características ausentes podem ser contornadas com o uso de aditivos na ensilagem, com o objetivo de elevar a recuperação de nutrientes e energia do material ensilado (KUNG JR., 2009).

Os aditivos podem ser classificados em dois principais tipos: estimulantes de fermentação que podem ser enzimas ou cepas de microrganismos, ou materiais ricos em açúcares solúveis que estimulam o desenvolvimento de bactérias ácido lácticas, e os inibidores de fermentação como os ácidos e formaldeído que inibem o crescimento microbiano (McDONALD et al., 2010). Ainda, dentre os aditivos estimulantes de fermentação, os inoculantes microbianos se dividem em dois principais grupos de microrganismos: as bactérias homofermentativas que são fermentadoras de açúcar em, exclusivamente, ácido láctico contribuindo na aceleração da queda de pH das silagens, e as bactérias

heterofermentativas que são microrganismos capazes de fermentar substratos em, além de ácido láctico, outros ácidos que podem contribuir para a elevação da estabilidade aeróbia do material ensilado (SCHMIDT et al., 2014).

A inoculação de bactérias ácido lácticas homofermentativas (BALho), pode resultar em maior taxa de fermentação, menor proteólise, menor produção de ácido acético e butírico, menor produção de etanol, enquanto aumentam a produção de ácido láctico e recuperação de nutrientes (KUNG JR et al., 2003). Ainda segundo Kung Jr et al. (2003), as maiores taxas de produção de ácido láctico são devido ao menor período de colonização dos microrganismos e sua robustez; menor proteólise e deaminação devido a inibição das cepas de clostrídeos, proteases da própria planta ensilada e pela rápida redução do pH. Ainda pela dominância das BALho's pode se explicar menores concentrações de ácido butírico e acético, além da menor concentração de etanol.

Em geral, os aditivos microbianos contendo as BALho's são mais efetivos em silagens de plantas específicas como a alfafa, gramíneas em geral e trevo quando comparado ao seu efeito em silagens de cereais. Provavelmente pelo fato dos cereais possuírem em sua fauna epifítica maiores contagens de BALho. Entretanto, esses microrganismos parecem ser pouco efetivos em silagens de milho e de grãos (MEESKE; BASSO, 1998).

Uma função importante dos aditivos de ensilagem é o beneficiamento na estabilidade aeróbia desse alimento após a abertura. Os *Lactobacillus buchneri* são microrganismos heterofermentativos capazes de produzir, além de ácido láctico, outros ácidos orgânicos como o acético, que são importantes para a estabilidade aeróbica das silagens (DRIEHUIS et al., 1999; TABACCO et al., 2009), ainda são capazes de converter ácido láctico em acético, 1,2-propanodiol e etanol em pequenas quantidades.

O uso de microrganismos heterofermentativos já foi descrito como desvantajoso em relação ao uso de apenas microrganismos homofermentativos, por ocorrer maiores perdas de matéria seca convertidas em ácidos orgânicos (McDONALD et al., 1991). Porém, a melhora na estabilidade aeróbica das silagens com o uso de bactérias heterofermentativas pode compensar esse fator, sendo que, seus benefícios após a exposição do material ao oxigênio são maiores que pequenas perdas (KUNG JR; RANJIT, 2001).

Enzimas capazes de degradar celulose, hemicelulose, lignina, amido entre outros componentes, são utilizadas em aditivos com a intenção de auxiliar na liberação de açúcares nas primeiras horas de fermentação para ajudar no abaixamento do pH (JORGESSEN; COWAN, 1989) e também melhorar a digestibilidade do alimento ensilado pela

desestruturação da fibra alimentar. Esse último fator, proporciona melhores níveis de fermentação ruminal e conseqüentemente melhor desempenho animal e a maior liberdade na época de colheita em relação ao estágio de maturação das plantas sem perda significativas no desempenho animal (KUNG et al., 2003).

## 2.6 DEGRADABILIDADE IN VITRO DOS CARBOIDRATOS

A taxa de degradação ruminal dos nutrientes é fator importante na previsão do suprimento de energia para o ruminante a partir dos alimentos. Alimento esse, que estabelece condições de ambiente ruminal importante para o número, espécies e atividade microbiana e eficiência na síntese desses microrganismos. Além disso, o alimento é delineador da composição molar e taxas de absorção dos ácidos graxos voláteis (AGV's) produzidos, fornecimento de aminoácidos pós-ruminal e conseqüentemente a ingestão de matéria seca (VALADARES FILHO et al., 2011).

Ainda segundo Valadares Filho et al. (2011), a degradabilidade do alimento é influenciada pela composição química do alimento, tamanho de partícula e a maturidade da planta que, por sua vez, influencia a composição tecidual da planta.

Portanto, mudanças que ocorrem na composição do alimento e no tamanho de partícula durante o processo de ensilagem, como a moagem e a fermentação, podem alterar significativamente parâmetros de fermentação ruminal dos carboidratos, sendo então importante identificar e entender essas mudanças que podem ocorrer no alimento.

McAllister et al. (1994) descreveram a importância da adesão dos microrganismos na digesta para a fermentação dos seus nutrientes, já que esse é o primeiro passo da digestão de um alimento recém ingerido. As bactérias que aderem às partículas são de 70 a 80% da massa microbiana ruminal. Essa adesão faz parte do processo fermentativo do alimento e é necessária para liberação de suas enzimas no substrato, concentrando em uma pequena área do processo de digestão, o que os torna mais eficientes (CHESSON; FORSBERG, 1988).

Após a adesão à partícula, o microrganismo necessita penetrar e ultrapassar as barreiras existentes no alimento para acessar o substrato. O grau de adesão e penetração na partícula é refletido no tempo de colonização (Lag Time) de fermentação, o que caracteriza a digestão ruminal de vários alimentos (VALADARES FILHO et al., 2011).

A retenção da digesta no rúmen depende do tamanho da partícula, da densidade e da susceptibilidade dos componentes do alimento ao ataque bacteriano, retendo as partículas no rúmen, geralmente por duas ou três vezes a mais o tempo que o fluido ruminal

permanece (OWENS; GOETSCH, 1986). Essa retenção muda a partição de energia dos microrganismos que privilegiam a manutenção, prejudicando a síntese de proteína (RUSSEL; WALLACE, 1988), trazendo então uma menor produção de proteína microbiana. Por outro lado, alguns microrganismos de crescimento lento, como fungos e protozoários são beneficiados com a maior retenção das partículas no rúmen (WILLIAMS; COLEMAN, 1988).

Estudar as taxas de degradabilidade, o tempo de colonização para a fermentação e a energia liberada pelo processo auxilia na tomada de decisões importantes sobre o processamento do alimento e sobre a formulação das dietas para animais de produção.

As técnicas de degradabilidade *in vitro* têm sido desenvolvidas e testadas com a intenção de diminuir o custo e o tempo dos experimentos. Essas técnicas são executadas em simulação do sistema ruminal em laboratório que visa emular o processo de fermentação e digestão dos animais, fornecendo resultados precisos (MIZUBUTI, 2009).

## 2.7 AÇÚCARES REDUTORES NOS CARBOIDRATOS NÃO ESTRUTURAIIS

As unidades básicas dos carboidratos são os monossacarídeos constituídos de pelo menos 3 átomos de carbono (C), hidrogênio (H<sub>2</sub>) e oxigênio (O), e sua diversificação se dá pelo número de átomos de C e na organização dos átomos de H e O ligados à cadeia de carbono (VOET et al., 2002). Quando combinadas, essas unidades básicas podem formar, dissacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos, também chamados de açúcares. Esses açúcares, quando possuem extremidade reductoras, são capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em soluções alcalinas.

A glicose é um monossacarídeos dentre os carboidratos não estruturais, sendo constituintes de estruturas energéticas nas plantas, como o amido. Portanto, pequena parte dos carboidratos sintetizados pelas plantas encontram-se na forma de monômeros livres (ANTUNES et al., 2011), pois são rapidamente utilizados na formação de compostos maiores e importantes para a reserva energética das plantas.

O amido é um polissacarídeo de glicose, com alto peso molecular, e longas cadeias de monômeros que formam os grânulos de amido, como explanado anteriormente. Quando o alimento adentra o rúmen, colônias de bactérias se aderem ao amido e liberam enzimas digestivas que são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas. Esse processo facilita a fermentação desses sacarídeos por outros grupos de bactérias (McALLISTER et al., 1994).

Sendo assim, o ataque das enzimas microbianas ao amido durante o processo de ensilagem do milho, por meio da hidrólise das ligações glicosídicas tanto das ligações  $\alpha$ -

1,4 como as ligações  $\alpha$ -1,6, podem liberar extremidades reductoras em sua estrutura. Essas podem ser ponto de partida para a completa fermentação do polissacarídeo durante a fermentação ruminal ou até maior aporte de substrato durante a fermentação láctica no silo.

Na busca pela melhor eficiência de digestão do amido pelos ruminantes, o uso de aditivos com a capacidade de desestruturação da matriz proteica e do amido no endosperma do grão de milho, melhorando a degradabilidade desses substratos, pode proporcionar, quando o alimento é oferecido para animais de grande produção e com altas taxas de consumo e passagem de sólidos no rúmen, melhor desempenho animal.

## REFERÊNCIAS

- ANTUNES, R.C; RODRIGUEZ N.M; SALIBA, E.O.S. Metabolismo de carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**, 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap 8.
- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 60-71, 2016.
- BALL, S.G.; VAN DE WAL, M.H.B.J.; VISSER, G.F. Progress in understand biosynthesis of amylose. **Trends in Plant Science**. Vol. 3, n. 12, p. 462-467, Dez. 1998.
- BARON, V.S. et al. Proteolysis and fermentation of grain-corn ensiled at several moisture levels and under several simulated storage methods. **Canadian Journal of Animal Science**, v.66, n. 2, p. 451-461, June 1986.
- BITENCOURT, L.L. Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras. 2012. 130p. **Tese (Doutorado em Zootecnia)**, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- BOLSEN, K. K. et al. Effect of silage additives on the microbial succession and fermentation process of alfafa and corn silages. **Journal of Dairy Science**, Vol. 75, p. 3066-3083, 1992.
- CHESSON, A.; C. W. FORSBERG. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: P. N. Hobson. **The Rumen Microbial Ecosystem**. p 77. Elsevier Science Publishing, New York, 1988.
- CROCKER, L. M. et al. Influence of processed corn grain in diets of dairy cows on digestion of nutrients and milk composition. **Journal of Dairy Science**. vol.81 n. 9, p.2394-2407, 1998.
- DAVIDE, L.M.C. **Controle genético de caracteres associados à dureza dos grãos e à degradabilidade ruminal de milhos tropicais**. 2009. 89p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- DRIEHUIS, F.; OUDE ELFERINK, W.H.; SPOELSTRA, S.F. Anaerobic lactic acid degradation during ensilage of whole crop corn inoculated with *Lactobacillus buchneri* inhibits yeast growth and improves aerobic stability. **Journal of Applied Microbiology**, v.87, n.4, p.583-594, 1999.
- FERRARETTO L. F. et al. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, vol. 96 n. 1, p.533-550, 2013.
- FERRARETTO, L.F.; SHAVER, R.D.; HOFFMAN, P.C. Effect of time of storage on ammonia concentration and ruminal *in vitro* digestibility of high moisture corn: a field survey. **Journal of Dairy Science**, v.96, p.149, 2013. Supplement 1.
- FERRARETTO, L.F; et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal *in vitro* starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, Vol. 97, n. 5, p. 3221-3227, 2014

- HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.
- KUNG JR., L.; RANJIT N.K. The effect of *Lactobacillus buchneri* and other additives on the fermentation and aerobic stability of barley silage. **Journal of Dairy Science**, v.84, n.5, p.1149-1155, 2001.
- KUNG JR., L.; STOKES, M.R.; LIN, C.J. Silage additives. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage science and technology**. Wisconsin, 2003. p.305-360. Cap. 7.
- KUNG JR., L. Side effects of microbial inoculants on silage fermentation. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FORAGE QUALITY AND CONSERVATION, 1. 2009, São Pedro. **Proceedings...** Piracicaba: FEALQ, 2009. p.7-26.
- KUNG JUNIOR, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1707-1712, 2014.
- LOPES, J. C. et al. Type of corn endosperm influences nutrient digestibility in lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 92 n. 9, p.4541-4548, 2009.
- MAENG, W.J e BALDWIN, R. L. Factors influencing rumen microbial growth rates and yields: effect of amino acid additions to a purified diet with nitrogen from urea. **Journal of Dairy Science**, vol. 59 n.4, p.648-655, 1976.
- MARTINS A. S. et al. Degradabilidade ruminal *In Situ* da matéria seca e proteína bruta das silagens de milho e sorgo e de alguns alimentos concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol. 28 n.5, p. 1109-1117, 1999.
- McALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of animal Science**. Vol. 72, p. 3004-3018, 1994.
- MCDONALD, P.; HENDERSON, A.R.; HERON S.J.E. **The biochemistry of silage**. Marlow: Chalcomb Publications, 1991. 340p.
- MCDONALD, P., et al. **Animal Nutrition**. Harlow, United Kingdom: Pearson Education Limited, 2010. 712p.
- MEESKE, R.; BASSON, H.M. The effect of a lactic acid bacterial inoculant on maize silage. **Animal Feed Science Technology**. Vol. 70 n. 3 p. 239-247. 1998.
- OHSHIMA, M.; MCDONALD, P. A review of the changes in nitrogenous compounds in herbage during ensilage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 29, n. 6, p. 497-505, 1978.
- OWENS, F. N., R. A. Zinn, and Y. K. Kim. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, Vol. 63 No. 5, p. 1634-1648, 1986.
- OWENS, F. N., and A. L. GOETSCH. Digesta passage and microbial protein synthesis. In: L. P. Milligan, W. L. Grovum, and A. Dobson (Ed.) **Control of Digestion and Metabolism in Ruminants**. p 196. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1986.

- PAIVA, E. et al. Quantitation and distribution of  $\gamma$ -zein in the endosperm of maize kernels. **Cereal Chemistry**. Vol. 68 p. 276, 1991.
- PEREIRA, M. N. et al. Silagem de milho reidratado na alimentação de gado leiteiro. **Informe agropecuário**. v. 34, n. 277, p.7-18, 2013.
- PHILIPPEAU C. and B. MICHALET-DOREAU. Influence of genotype and ensiling of corn grain on *in situ* degradation of starch in the rumen. **Journal of Dairy Science**. Vol. 81 n. 8, p.2178-2184, 1998.
- PIMENTEL, M.A.G e FONSECA, M.J.O. **Cultivo de milho: Secagem e Armazenamento**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-012X, 2012.
- PRATT, R.C. Association of zein classes with maize kernel hardness. **Cereal Chemistry**. Vol. 72, n.2, p. 162-167. 1995.
- REYNOLDS, C.K; HARMON, D.L.; CECAVA, M.J. Absorption and delivery of by portal-drained visceral nutrients for milk protein synthesis. **Journal of Dairy Science**. Vol. 77 n° 9, p. 2787-2808, 1994.
- REYNOLDS, J.D., SUTTON, J. D., BEEVER, D. E. Effects of feeding starch to dairy cattle on nutrient availability and production. In: **Recent advances in animal nutrition**.1. ed. p. 105-134, 1997.
- RUSSELL, J. B.; R. J. WALLACE. Energy yielding and consuming reactions. In: P. N. Hobson, **The Rumen Microbial Ecosystem**. p 185. Elsevier Science Publishing, New York, 1988.
- SANTOS, J. P. **Armazenagem de milho a granel na fazenda**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 6 p. ISSN 1518-4269, 2004.
- SCHMIDT, P.; SOUZA, C.M.; BACH, B.C. Uso estratégico de aditivos em silagens: Quando e como usar? In: JOBIM, C.C.; CECATO, U.; CANTO, M.W.; BANKUTI, F.I (eds.), **SIMPÓSIO: PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS**, 5.ed. **Anais...** Maringá: UEM p.243-264, 2014.
- SILVA J. F. C. Mecanismos reguladores de consumo. In: BERCHIELLI T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**, 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap 3.
- TABACCO, E. et al. Clostridia spore formation during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* inoculants. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.5, p.1632-1641, 2009.
- TESTER R.F; KARKALAS J.; QI X. Starch-composition, fine structure and architecture. **Journal of Cereal Science**. Glasgow, UK. v. 39, p.151-165, 2004.
- THEURER, C. B. Grain Processing effects on starch utilization by ruminants; University of Arizona, Tucson; **Journal of Animal Science**. v.63, n.5, p. 1649-1662, 1986.
- THEURER, C.B. et al. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.9, p.1950-1959, 1999.

VALADARES FILHO, S. C. E PINA, D.S. Fermentação Ruminal. In: BERCHIELLI T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**, 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap 6.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2.Ed. London. Constock Publishing Associates, USA, 1994. 476p.

VOET, D.; VOET, J.G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed editora. 932p. 2002.

WALLACE, J. C et al. New methods for extraction and quantitation of zeins reveal a high content of  $\gamma$ -zein in modified opaque-2 maize. **Plant Physiology**. Vol. 92 p. 191, 1990.

WANG, T.L.; BOGRACHEVA, T.Y; HENDLEY, C.L. Starch: as simple as A, B, C? **Journal of Experimental Botany**. Vol. 49, n° 320, p. 481-502, 1998.

WILLIAMS, A. G., and G. S. COLEMAN. The rumen protozoa. In: P. N. Hobson **The Rumen Microbial Ecosystem**. p 77. Elsevier Science Publishing, New York, 1988.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Objetivou-se avaliar a influência do tempo de armazenamento sobre a qualidade nutricional do amido de silagens de grãos hidratados de milho com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a ensilabilidade de grãos de milho maduros hidratados com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano;
- Avaliar os efeitos da fermentação sobre a estrutura dos grânulos de amido nos diferentes tempos de armazenamento por meio de imagens de microscopia eletrônica de varredura;
- Avaliar a cinética de degradação de carboidratos de dietas contendo silagem de grãos de milho hidratados;
- Avaliar a relação entre o N-amoniaco da silagem de grãos de milho hidratados e a cinética de degradação ruminal de carboidratos;

**4 ARTIGO**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A QUALIDADE  
NUTRICIONAL DE SILAGENS DE GRÃOS DE MILHO HIDRATADOS COM OU  
SEM USO DE ADITIVO ENZIMO-MICROBIANO**

**EFFECT OF STORAGE TIME ON THE NUTRITIONAL QUALITY OF HYDRATED  
GROUND CORN SILAGE WITH OR WITHOUT ENZYME-MICROBIAL  
INOCULATION**

## RESUMO

A ensilagem de grãos hidratados é uma técnica que consiste em adicionar água ao grão de milho, moído ou inteiro para que ocorra a fermentação após a ensilagem dos grãos. Objetivou-se, avaliar o efeito do tempo de armazenamento de silagens de grãos de milho hidratados com ou sem uso de aditivo enzimo-microbiano sobre a estrutura do amido e das prolaminas que o envolvem, assim como o efeito na cinética de degradabilidade ruminal de dietas de vacas leiteiras contendo a silagem. Os grão de milho foram hidratados e ensilados manualmente em baldes de polietileno, com e sem a inoculação do aditivo e abertos em quatro diferentes tempos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias). Após esse período, as silagens foram submetidas a análises de parâmetros fermentativos, análises bromatológicas e químicas. Além disso, foram confeccionadas dietas contendo as silagens de grãos hidratados e grãos moídos para análises dos parâmetros de degradação ruminais de carboidratos. No ato da ensilagem e nos respectivos tempos de abertura dos silos, foram coletadas amostras e dissecadas manualmente para análise de microscopia eletrônica de varredura. Os dados foram analisados segundo um delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 4x2, considerando 5% de significância. O tempo de armazenamento apresentou efeito sobre a estrutura do amido e das prolaminas com acentuação nas silagens inoculadas com aditivo enzimo-microbiano. Houve comportamento linear decrescente nos teores de lignina para essas silagens. Durante o tempo de armazenamento, as silagens confeccionadas com uso de aditivo enzimo-microbiano apresentaram maiores níveis de degradação, liberando mais extremidades redutoras nas cadeias de amido. Essas condições influenciaram positivamente nas taxas de degradação e no tempo de colonização dos carboidratos fibrosos e não fibrosos das dietas incubadas com as silagens, porém apresentaram menores volumes de degradação ruminal de carboidratos. Em comparação com dietas contendo milho moído, houve aumento das taxas de degradação de carboidratos, diminuição no tempo de colonização do substrato, porém menor volume de gases produzidos pelos carboidratos. Portanto conclui-se que, o aditivo enzimo-microbiano pode ser utilizado na confecção de silagem de grãos de milho hidratados e que longos períodos de armazenamento podem alterar a estrutura do endosperma e melhorar a fermentação ruminal do amido.

**Palavras-chave:** Amido. Degradabilidade ruminal. Milho hidratado. Tempo de armazenamento.

## 1 INTRODUÇÃO

A adição do milho como principal fonte de energia em dietas de vacas em lactação, é amplamente utilizada para proporcionar bom desempenho e aceitação pelos animais. Portanto, por ser um alimento utilizado em grande escala na produção de leite, merece olhar atento do produtor e do nutricionista sobre o preço e a eficiência do uso desse alimento pelos animais. Sendo o principal componente do milho o amido, portanto, é o nutriente fundamental na nutrição dos rebanhos leiteiros, já que sua fermentação no rúmen é responsável pela melhoria no desempenho dos animais em lactação (FREDIN et al., 2014).

Em resposta às oscilações do preço do milho no Brasil, fator extrínseco ao produtor, desenvolveu-se técnicas como a ensilagem desse alimento para proporcionar maior controle sobre o custo anual de dietas que contém milho. A ensilagem de grãos hidratados é uma técnica que consiste em adicionar água ao grão de milho, moído ou inteiro, até atingir teores de umidade superiores a 25%, para que ocorra a fermentação, sendo possível, que o produtor produza a maior parte do alimento concentrado que será oferecido ao seu rebanho, na época em que desejar (PEREIRA, 2013). Apesar de ser uma técnica bem conhecida pelos produtores brasileiros, muitas dúvidas ainda não foram respondidas pela pesquisa.

Os híbridos de milho utilizados no Brasil em sua maioria, apresentam endosperma de maiores proporções vítreas, possuindo então, grânulos de amido com alta relação de cadeias helicoidais, o que torna essa estrutura adensada (DAVIDE, 2009). Além disso, as zeínas que envolvem o grânulo de amido possuem característica hidrofóbica, que prejudica o acesso microbiano ao nutriente (PEREIRA, 2013).

O grão de milho quando ensilado por longos períodos de armazenamento, pode, por meio da degradação contínua e da alteração na estrutura das zeínas e

dos grânulos de amido que compõe o endosperma do grão, proporcionar melhor digestibilidade, portanto, melhor aproveitamento do alimento pelos animais (CROCKER et al., 1998).

Para silagens de grãos, é recomendado o uso de aditivo para melhorar a fermentação e assim proporcionar melhor conservação (KUNG JR. et al., 2003), já que é um alimento nobre em termos nutricionais. A utilização de aditivos que contém enzimas na ensilagem de grãos não é amplamente estudada, porém pode trazer benefícios nutricionais para o alimento.

Portanto, objetivou-se avaliar o efeito do tempo de armazenamento de silagens de grãos de milho hidratados com ou sem uso de aditivo enzimo-microbiano sobre a estrutura do amido e das prolaminas que o envolvem, assim como o efeito na cinética de degradabilidade ruminal de dietas de vacas leiteiras contendo a silagem como fonte de amido.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado na Fazenda Escola e no Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina. O grão maduro de milho foi adquirido comercialmente e moído ao tamanho geométrico médio de aproximadamente 417  $\mu\text{m}$  (ZANOTTO; BELLAVÉR, 1996). Após moagem foi realizado análise de matéria seca (MS), descrita na AOAC (1990). A hidratação foi feita com a proporção de 35 litros de água para cada 100 kg de material a ser ensilado para atingir umidade entre 35 e 40%. Foram confeccionados em baldes de plástico, 12 silos experimentais de grãos de milho hidratado sem uso de nenhum aditivo (SGH) e 12 silos experimentais com uso de aditivo enzimo-microbiano Biotrato<sup>®</sup> (SLO agropecuária) conforme a recomendação do fabricante (SGHA).

Cada mini-silo continha aproximadamente 4,5 kg de material ensilado com densidade média de 1178 kg/m<sup>3</sup>.

O aditivo utilizado continha *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus buchneri*, e 8% de enzimas celulolíticas (celulase, hemicelulase,  $\beta$ -glucanase e xilanase). É indicado pelo fabricante para ensilagem de material com baixa umidade e forragens fibrosas.

Os silos experimentais, com e sem o uso de aditivo, foram abertos após 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento com quatro repetições cada. Após a abertura, coletou-se amostras frescas para análise de microscopia eletrônica de varredura, determinação de pH e capacidade tampão. Outras amostras foram congeladas para posteriores análises.

### 2.1 Análises bromatológicas

As amostras foram descongeladas e submetidas à pré-secagem em estufa de ventilação forçada à 55°C por 72 horas, posteriormente moídas em moinho tipo “Willey” com peneira de 1 mm.

O material moído foi submetido à análises para determinação dos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), lignina (LIG), hemicelulose (HEM) conforme metodologias da AOAC (1990) e fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) segundo Detmann et al. (2010).

**Tabela 1.** Características bromatológicas de silagens de grãos de milho hidratados

Silagem	Fração				
	MS (g/kg)	PB (g/kg MS)	FDN (g/kg MS)	FDA (g/kg MS)	EE (g/kg MS)
SGH 30	583	106	171	27	35
SGH 60	601	101	173	22	39
SGH 90	597	102	160	25	42
SGH 120	599	102	177	30	39
SGHA 30	583	101	163	25	33
SGHA 60	588	102	170	20	39
SGHA 90	593	101	176	24	47
SGHA 120	629	103	161	23	41

SGH: Silagem de grãos de milho hidratados sem uso de aditivo nos respectivos tempos de armazenamento. SGHA: Silagem de grãos de milho hidratados com uso de aditivo enzimo-microbiano nos respectivos tempos de armazenamento. MS: matéria seca. PB: proteína bruta. FDN: fibra insolúvel em detergente neutro. FDA: fibra insolúvel em detergente ácido. EE: extrato etéreo.

### 2.2 Determinação de pH, N-amoniacal e capacidade tampão

O pH das silagens foi determinado com potenciômetro digital da marca Az<sup>®</sup> 86505, logo após cada abertura de silo. As amostras frescas foram trituradas em almofariz com água destilada e o macerado foi centrifugado para se obter o sobrenadante usado na determinação de N-amoniacal segundo a metodologia descrita por Mizubuti et al. (2009). Foram separadas de 10 a 20 g de amostras frescas para determinação da capacidade tampão das silagens descritas também por Mizubuti et al. (2009).

### 2.3 Determinação de açúcares redutores

As amostras foram diluídas em água destilada em concentração de 4% e submetidas à análise de detecção de açúcares redutores pelo método de Somogyi e Nelson (NELSON, 1994).

### 2.4 Microscopia eletrônica de varredura da estrutura dos grânulos de amido

Anteriormente e após a inoculação com aditivo e a abertura dos silos, alguns grãos, selecionados aleatoriamente foram avaliados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) empregando-se o equipamento FEI Quanta 200 (FEI Company, Holanda) com atmosfera de vácuo de 10<sup>6</sup> torr. As amostras foram previamente

secas e montadas em suportes de alumínio com fita de carbono, pulverizadas com um filme de ouro (BALTEC SDC 050, Sputter Coater, Alemanha) e observadas em MEV. As eletromicrografias foram geradas em modo topográficos (elétrons secundários) a 20 kV.

### 2.5 Cinética de degradabilidade ruminal dos carboidratos de dietas contendo silagem de grãos de milho hidratados

As dietas foram formuladas (Tabela 2) pelo software AMTS.Cattle.Pro® que utiliza equações baseadas no sistema de exigências da Universidade de Cornell (CNCPS), para vacas holandesas com peso médio de 655 kg, escore de condição corporal (ECC) 3,00, ganho de peso diário 0,150 kg/dia e produção de 30 kg de leite/dia com 3,8% de gordura e 3,1% de proteína verdadeira.

**Tabela 2.** Composição centesimal e composição química das dietas incubadas para análise da cinética de degradabilidade ruminal

Composição Centesimal da Dieta (g/kg)	Dietas		
	MM <sup>1</sup>	SGH <sup>2</sup>	SGHA <sup>3</sup>
Milho moído	424	-	-
Silagem de grão de milho hidratado	-	424	424
Farelo de Soja	83	83	83
Pré-secado de Azevém	297	297	297
Feno Tifton 85	200	200	200
Composição Química (g/kg MS)			
Matéria seca	891	657	657
Proteína bruta	140	138	138
Carboidratos não fibrosos	412	410	410
Fibra em detergente neutro	352	357	357
Lignina	43	45	36
Extrato etéreo	32	38	38

<sup>1</sup>Dieta calculada com uso de milho moído. <sup>2</sup> Dieta calculada com uso de silagem de grãos de milho hidratados sem uso de aditivo (média de todos os tempos de armazenamento), em substituição total ao milho moído. <sup>3</sup>Dieta calculada com uso de silagem de grãos de milho hidratados com uso de aditivo enzimo-microbiano (média de todos os tempos de armazenamento), em substituição total ao milho moído.

O líquido ruminal foi coletado manualmente através da cânula ruminal de um bovino de aproximadamente 42 meses, castrado, pesando aproximadamente 500

kg. Para adaptação, os animais foram alimentados com uma dieta de relação volumoso:concentrado de 55:45 e constituída de silagem de milho e ração concentrada a base de milho e farelo de soja.

O animal foi mantido em baia de alimentação individual por um período de adaptação de dez dias. Após esse período, a coleta de líquido ruminal se deu antes da alimentação do animal no período da manhã, filtrado em tecido de algodão com malha fina e colocado em garrafa térmica previamente aquecida a 39° C para o transporte ao Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal da UEL. Em seguida foram incubadas amostra da dieta anteriormente formulada, substituindo apenas o milho moído pela silagem de grãos de milho hidratados em seus respectivos tratamentos e tempo de armazenamento, em 5 repetições.

Os parâmetros cinéticos de degradação ruminal foram estimados a partir da técnica semiautomática de produção cumulativa de gases *in vitro* descrita por Schofield, Pitt e Pell (1994). Para tal, foram pesados 300 mg de amostra seca ao ar (ASA) moídas a 1 mm, e colocadas em frascos de 50 mL. Todos os frascos receberam 24 mL de solução tampão de McDougal (1949), previamente reduzida com CO<sub>2</sub> até atingir pH 6,9. Posteriormente, foram adicionados, em cada frasco, 6 mL do inóculo oriundo do bovino fistulado no rúmen, sob aspersão de CO<sub>2</sub> e mantidos em Shaker a 39° C. Para os ajustes de variação, foram incubados frascos sem substrato, considerado brancos para desconto do volume de gases provenientes do líquido ruminal e da solução tampão.

A pressão dos gases que foram produzidas pela fermentação do substrato e acumulada nos frascos, foi mensurada, por meio de um manômetro modelo MPD-79, de marca Instrutherm, nos tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96 e 144 horas. Após cada mensuração foi realizada a despressurização.

Os valores de pressão expressos em Psi foram convertidos em volume (mL), conforme equação pré-estabelecidas para as condições locais: Volume (mL) =  $0,5702 + 3,2399 \times \text{Pressão} + 0,1074 \times \text{Pressão}^2$  ( $R^2 = 0,99$ ), corrigidos para uma grama de matéria seca, e descontados os valores obtidos nos frascos brancos.

Para a estimação dos parâmetros cinéticos da produção de gases, os dados foram ajustados utilizando-se o modelo estatístico biocompartimental (SCHOFIELD; PITT; PELL, 1994), descrito a seguir:  $V_{\text{final}} = \frac{VCNF}{(1 + \exp(2 - 4 \cdot kd_{CNF} \cdot (T - L)))} + \frac{VCF}{(1 + \exp(2 - 4 \cdot kd_{CF} \cdot (T - L)))}$ , em que VCNF = volume máximo da produção de gases da fração dos carboidratos não fibrosos (mL);  $kd_{CNF}$  = taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos ( $h^{-1}$ ); L= tempo de colonização (h); VCF = volume máximo da produção de gases da fração dos carboidratos fibrosos ( $\% \cdot h^{-1}$ ) e  $V_{\text{final}}$  = volume final de gases produzidos (mL).

## 2.6 Estatística

Os dados foram analisados no programa estatístico R (2017), segundo um delineamento inteiramente casualizado fatorial 4x2 com 4 repetições, exceto os parâmetros da cinética de degradabilidade ruminal que foram analisados com 5 repetições. Onde não houve interação entre os fatores, os dados foram analisados com a média dos fatores. Foi considerado 5% de significância.

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diminuição do pH de, em média, 4,31 para silagens sem uso de aditivo para 3,85 ( $p < 0,05$ ) para silagens com uso do aditivo enzimo-microbiano.

Muitos inoculantes vem sendo usado para melhorar a estabilidade aeróbia da silagem (BASSO et al., 2012), portanto é comum a existência de bactérias lácticas nesses aditivos, podendo explicar a melhora na capacidade de redução do pH durante a fermentação no silo. Considerando o pH como o principal fator de

conservação do alimento ensilado, o incremento de bactérias lácticas causado pelo uso do aditivo é um benefício considerável.

A capacidade tampão (CT) e o nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) são parâmetros importantes no tocante à estabilidade aeróbia da silagem, além de que o N-NH<sub>3</sub> pode ser relacionado com a deaminação de prolaminas que envolvem os grânulos de amido (HOFFMAN et al., 2011). Nesse estudo, houve aumento desses parâmetros diretamente relacionados com o aumento do tempo de armazenamento das silagens (Figura 2). Já em relação ao uso do aditivo, as silagens não apresentaram diferença significativa, também não houve interação entre os fatores ( $p>0,05$ ).

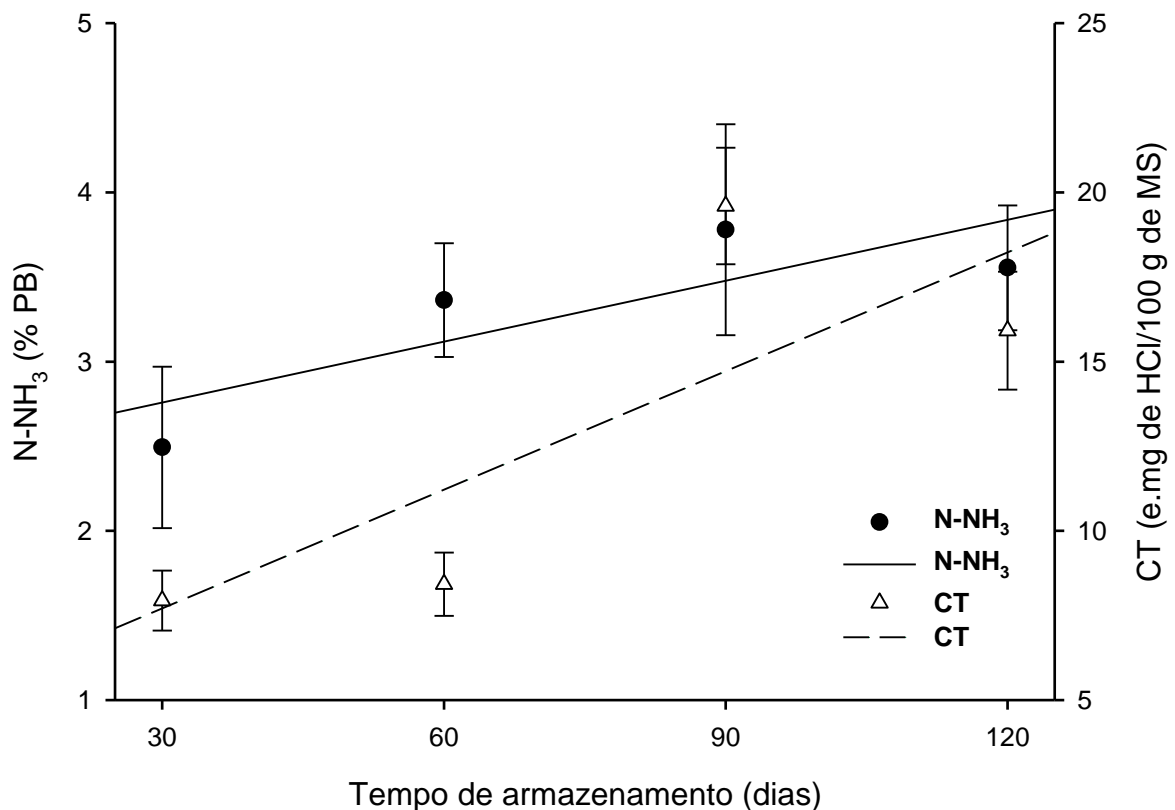


Figura 1. Nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e capacidade tampão (CT) de silagens de grãos de milho hidratados. N-NH<sub>3</sub>:  $Y = 2,396875 + 0,012012x$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,117;  $R^2 = 0,38$ ;  $P < 0,001$ . CT:  $Y = 4,19 + 0,11706x$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,9212;  $R^2 = 0,585$ ;  $P < 0,001$ .

A maior concentração de  $N-NH_3$  no meio pode aumentar a capacidade tamponante da silagem, já que o nitrogênio é um agente tamponante, o que pode explicar a relação direta e positiva dos parâmetros. Apesar de alta capacidade tamponante nas silagens não serem desejadas, é antes da estabilização da fermentação, que ocorre aproximadamente após 21 a 28 dias, que o pH deve se aproximar de 3,8. Portanto, todas as silagens apresentaram bons níveis de fermentação, não sendo o aumento da capacidade tamponante, após esse período, fator negativo.

Hoffman et al. (2011) e Arcari et al. (2016), também observaram o aumento da concentração de  $N-NH_3$  para silagens de grãos úmidos e hidratados de milho em relação ao aumento do tempo de armazenamento, fator que foi relacionado ao aumento da degradação do amido no rúmen.

Altas concentrações de  $N-NH_3$  podem indicar atividades de bactérias do gênero clostrídeo que produzem altas quantidades de nitrogênio em forma de amônia em seu metabolismo quando comparado com outros microrganismos (MILLER et al., 1966). Porém, as silagens apresentaram pH menores que 4, sendo um ambiente hostil para clostrídeos proteolíticos (PAHLOW et al., 2003), fundamentando a hipótese de que o nitrogênio amoniacal foi proveniente da deaminação das prolaminas do milho.

Após 30 dias de armazenamento, houve comportamento linear negativo do teor de lignina insolúvel em detergente ácido (LDA) do material ensilado com o uso do aditivo enzimo-microbiano (Figura 1). Enzimas do grupo celulase são capazes de degradar o complexo lignocelulose (PLATT et al., 1984). Segundo Couto et al. (2006) e Singh et al. (2016) essas enzimas podem ter sua atividade favorecida em meios com pH entre 3 e 4 por longos períodos de tempo. Portanto, o tempo de

armazenamento prolongado pode ter favorecido a atividade contínua dessas enzimas, já que o aditivo utilizado é recomendado para uso em forragens fibrosas. Na silagem sem o uso de aditivos, o teor de lignina não diferiu ( $P>0,05$ ) com o aumento do tempo de armazenamento.

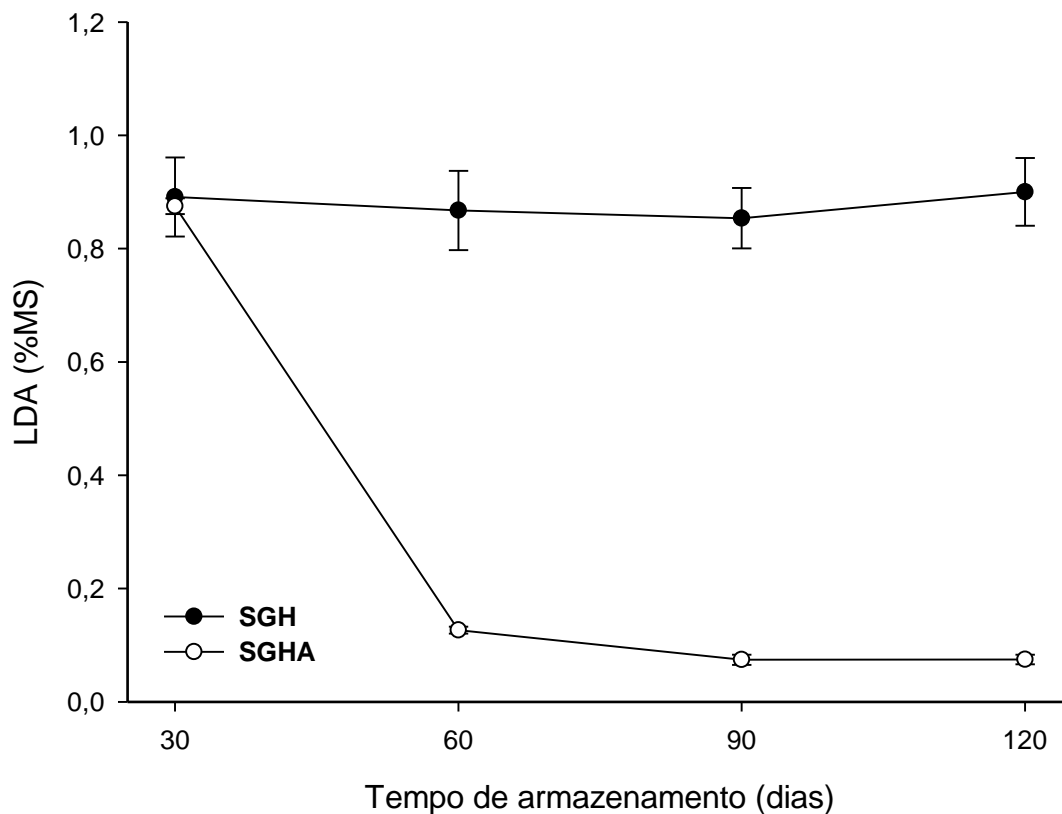


Figura 2. Teores de lignina insolúvel em detergente ácido (LDA) de silagens de grãos de milho hidratados. Aditivo:  $Y = 0,900875 - 0,008177x$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,0057;  $R^2 = 0,651$ ;  $P<0,001$ . Controle:  $Y=0,8782$ .

Segundo Van Soest (1994), os microrganismos lácticos não são responsáveis pela degradação de compostos como a celulose, hemicelulose, pectina e amido, porém, outros microrganismos, enzimas e ácidos orgânicos, no decorrer do tempo de armazenamento, podem ser capazes de degradar esses componentes.

O uso do aditivo enzima-microbiano pode proporcionar modificação na estrutura complexo liginocelulose, indicando hidrólise nesses componentes e beneficiando o alimento em relação à qualidade nutricional.

Houve liberação de extremidades reductoras das cadeias de glicose durante o armazenamento do milho quando ensilados com uso do aditivo enzimo-microbiano (Figura 3). O comportamento linear crescente da concentração de glicose reductora no meio pode estar relacionado com a hidrólise das cadeias dos carboidratos complexos, indicando contínua ação enzimática após a estabilização da fermentação inicial do processo de ensilagem.

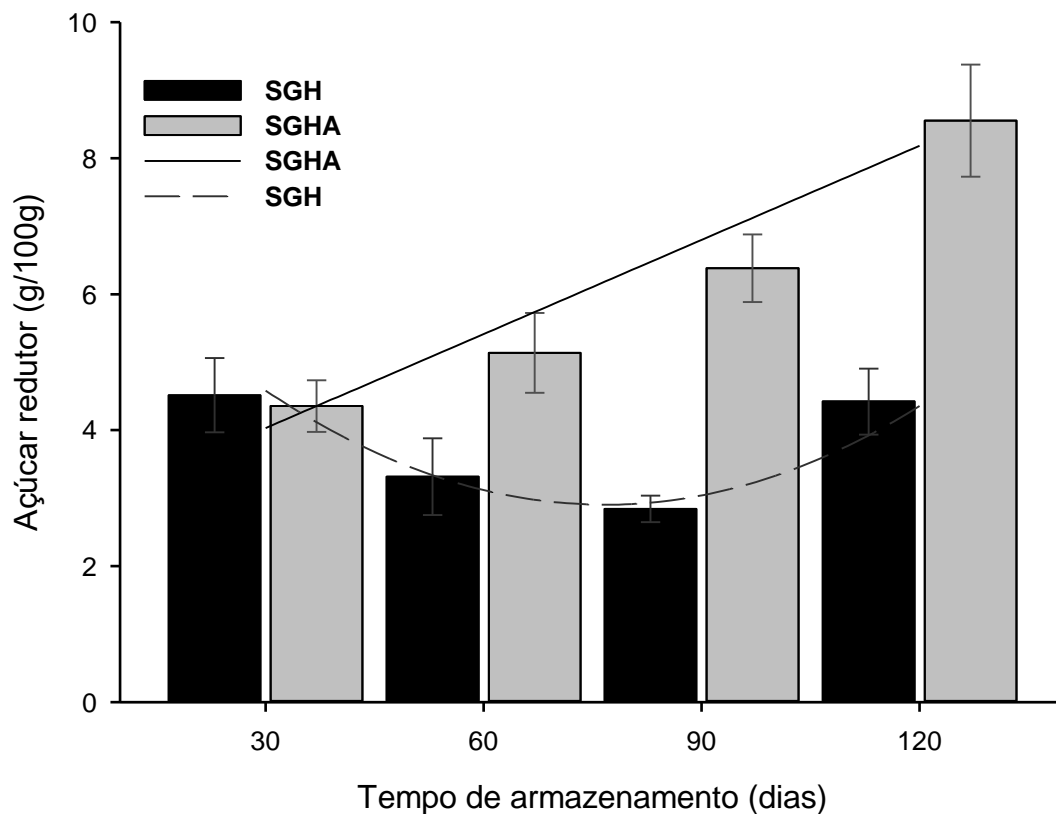


Figura 3. Concentração de açúcar reductor em silagens de grãos de milho hidratados. SGH: Silagem de grãos de milho hidratados sem uso de aditivo. SGHA: Silagem de grãos de milho hidratados com uso de aditivo enzimo-microbiano. SGHA:  $Y = 2,645250 + 0,046158x$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,4333;  $R^2 = 0,861$ ;  $P < 0,001$ . SGH:  $Y = 7,4383750 - 0,1184067x + 0,0007725x^2$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,213;  $R^2 = 0,721$ ;  $P < 0,001$ .

Hoffman et al. (2011), Ferrareto et al. (2014), Kung Jr. et al. (2014) e Arcari et al. (2016), observaram aumento da disponibilidade nutricional do amido em silagens de grãos úmidos e hidratados por meio do aumento do desaparecimento ruminal do amido. Além da proteólise de prolaminas, também verificada por esses autores, a

degradação parcial do amido durante o armazenamento, pode ser mais um fator determinante sobre a disponibilidade ruminal do amido. Segundo Theurer et al (1999), a modificação da estrutura do grânulo de amido e das prolaminas proporcionam maior área de contato do fluido ruminal com a digesta, aumentando o ataque bacteriano aos nutrientes.

Segundo Ferrareto et al. (2013), o incremento de degradação ruminal do amido afeta positivamente sua digestibilidade no trato total, elevando assim o suprimento de energia dos ruminantes, gerando maiores níveis de substrato para a síntese de leite. O propionato, principal ácido graxo produzido pela fermentação de amido no rúmen, por meio da gliconeogênese, se torna a principal fonte de glicose para os ruminantes (ANTUNES et al., 2011) e na glândula mamária a lactose, constituída pela glicose e galactose, é responsável por atrair a água para o lúmen das células secretoras de leite. É importante ressaltar que a eficiência de produção é um fator que traz maior rentabilidade, segundo Pereira et al. (2013), tal benefício pode até compensar o gasto com a ensilagem do milho.

O tempo de armazenamento interferiu ( $P < 0,05$ ) na cinética de degradação dos carboidratos não fibrosos das dietas contendo as silagens de grãos de milho hidratados (Tabela 3). O volume final de gases provenientes desses carboidratos apresentou comportamento quadrático, com ponto de mínimo de 175,802 mL  $g^{-1}$  de MS em aproximadamente 80 dias, o que indica menor nível de substrato disponível nas primeiras horas de fermentação ruminal. Porém a taxa de degradação desses carboidratos apresentou ponto máximo de 0,089 ( $h^{-1}$ ) em aproximadamente 92 dias de armazenamento.

Segundo Campos et al. (2000), o alimento pode ter baixa produção de gás no rúmen e ainda ter boa digestibilidade *in vivo*. Há vários fatores inerentes ao alimento

que influenciam negativamente o desenvolvimento microbiano, como o pH. O baixo pH das silagens pode ter influenciado na produção de gases provenientes dos carboidratos não fibrosos.

**Tabela 3.** Parâmetros da cinética de degradação dos carboidratos em dietas incubadas com silagem de grãos de milho hidratados com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano e em diferentes tempos de armazenamento.

	Tempo de armazenamento (dias)				P-valor			Equação	R <sup>2</sup> *
	30	60	90	120	A	T	AxT		
<b>VCNF</b>	216,93	176,57	182,90	198,07	0,703	<0,001	0,501	$Y = 275,585750 - 2,481018x + 0,015424x^2$	0,591
<b>kdCNF</b>	0,0681	0,0835	0,0891	0,0854	0,664	<0,001	0,167	$Y = 0,0434 + 0,00098x - 0,0000053x^2$	0,576
<b>VCF</b>	154,10	183,49	193,87	177,05	0,786	<0,001	0,152	$Y = 99,5575 + 2,19x - 0,013x^2$	0,545
<b>kdCF</b>	0,0198	0,0233	0,0238	0,0231	0,866	<0,001	0,109	$Y = 0,01473 + 0,00021x - 0,0000012x^2$	0,560
<b>Vfinal</b>	370,99	360,05	376,76	375,14	0,618	0,144	0,327	$Y=370,736$	-

A: uso de aditivo. T: tempo de armazenamento. AxT: interação entre os fatores. VCNF: volume de gases provenientes dos carboidratos não fibrosos. kdCNF: taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos. VCF: volume de gases provenientes dos carboidratos fibrosos. kdCF: taxa de degradação dos carboidratos fibrosos. Vfinal: volume final de gases produzidos após 144 h.

As taxas de degradação dos carboidratos não fibrosos apresentaram-se próximo aos teores descritos por Sniffen et al. (1992) para silagem de grãos de milho úmido (de 5 a 8%/h), e no ponto máximo da curva, obteve-se taxa maior do que a descrita pelos mesmos autores. O aumento da taxa de degradação desses carboidratos, suporta a teoria de que após longos períodos de armazenamento o amido se torna mais acessível à degradação microbiana no rúmen. Esse fator sugere melhor aproveitamento do alimento quando utilizado para animais com alto consumo que, conseqüentemente, possuem alta taxa de passagem de sólidos no rúmen, como por exemplo vacas em lactação.

Houve diferença ( $P < 0,05$ ), para o volume final de gases e a taxa de degradação dos carboidratos fibrosos das dietas contendo silagem de grãos de milho hidratados (Tabela 3), em relação ao tempo de armazenamento das silagens. Os dois parâmetros apresentaram comportamentos quadráticos com pontos

máximos de 191,84 (mL g<sup>-1</sup> de MS) com aproximadamente 84 dias e 0,024 (h<sup>-1</sup>) com aproximadamente 88 dias, respectivamente.

É importante ressaltar que os ácidos orgânicos e enzimas microbianas durante o armazenamento da silagem pode desorganizar as estruturas fibrosas, como já discutido anteriormente. Portanto, esse fator pode ter contribuído com maior acesso das bactérias ruminais à fibra, aumentando sua digestão. Entretanto, a contribuição da silagem para a fibra total da dieta foi pequena.

Segundo Arcuri et al. (2011), a elevada síntese de proteína microbiana é um fator essencial para maior fermentação ruminal do alimento. As elevações das taxas de degradação dos carboidratos não fibrosos trazem aos microrganismos ruminais maiores níveis de energia e, portanto, maior reprodução, fator esse que pode ter contribuído com a maior produção de gases provenientes dos carboidratos fibrosos da dieta e de suas respectivas taxas de degradação.

Para o tempo de colonização houve interação entre os fatores tempo e tratamento com aditivo ( $P < 0,05$ ) (Figura 4). Dietas contendo a silagem sem aditivo enzimo-microbiano apresentaram comportamento linear crescente, enquanto que as dietas contendo silagem com aditivo apresentaram comportamento quadrático com ponto mínimo de 1,31 (h) em aproximadamente 89 dias.

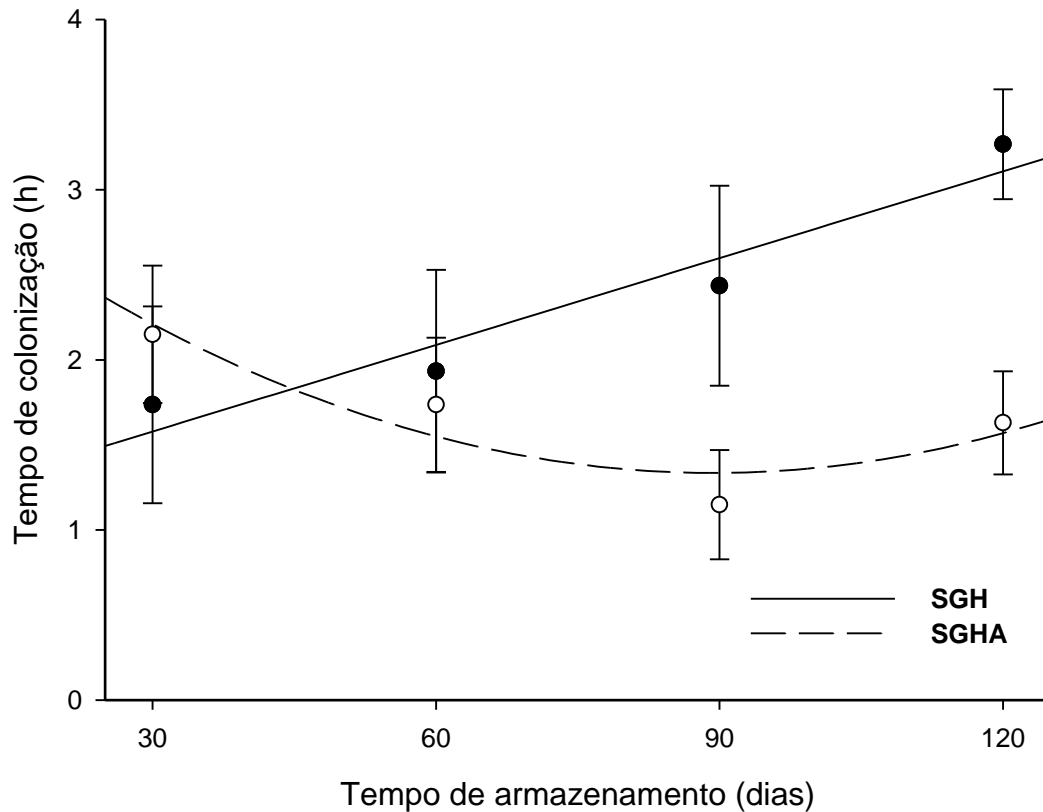


Figura 4. Tempo de colonização de silagens de grãos de milho hidratados ensilados com e sem aditivo enzimo-microbiano. SGH:  $Y = 1,06811 + 0,017x$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,1745;  $R^2 = 0,5623$ ;  $P=0,0001$ . SGHA:  $Y = 3,323 - 0,0445x + 0,000249x^2$ ; erro padrão da média (EPM) = 0,1101;  $R^2 = 0,4686$ ;  $P=0,0046$ .

O menor tempo de colonização nas dietas contendo silagem de grãos de milho hidratados, sugere que com o uso do aditivo e o aumento do tempo de armazenamento há maior facilidade de os microrganismos aderirem à superfície dos alimentos, pois para a adesão ocorrer é necessário que os microrganismos penetrem nas barreiras que protegem o substrato (McALLISTER et al., 1994). Sendo a silagem de milho uma grande porcentagem da dieta, os efeitos sobre as prolaminas, discutidos anteriormente nesse trabalho, pode ter sido a causa da maior facilidade acesso dos microrganismos ao amido e à fibra.

Entretanto para as dietas com uso de SGH sem o uso de aditivo, o aumento no tempo de colonização enfatiza o efeito que o aditivo proporciona, durante o

tempo de armazenamento, sobre as prolaminas e as estruturas fibrosas da silagem (Figura 1), refletindo então na dieta.

O volume final de gases produzidos não apresentou diferença entre as dietas com uso de SGH com e sem aditivo, assim como para o tempo de armazenamento ( $P>0,05$ ). Entretanto, para a obtenção de informações completas sobre a cinética de degradação, as dietas foram incubadas por 144 horas. É importante, principalmente para animais de altos níveis de consumo, que o alimento seja degradado com eficiência enquanto está no rúmen, já que a taxa de passagem dessa categoria animal é alta e o melhor aproveitamento do alimento no rúmen pode aumentar a eficiência do animal produzindo leite.

Por meio do teste de Dunnet, comparando a mesma dieta com o uso de milho moído e com silagem de grãos de milho hidratados com e sem uso de aditivo em diferentes tempos de armazenamento (Tabela 4), o volume final de gases produzidos não apresentou diferença estatística ( $P>0,05$ ).

O uso de dietas com o milho hidratado e ensilado apresentou maiores taxas de degradação dos carboidratos não fibrosos e fibrosos, efeito provavelmente advindo da desorganização das estruturas carboidratos pelos ácidos orgânicos e enzimas microbianas de fermentação na ensilagem do alimento.

**Tabela 4.** Parâmetros da cinética de degradação dos carboidratos em dietas ensiladas com milho moído (MM) e com silagem de grãos de milho hidratados com e sem uso de aditivo enzimo-microbiano e em diferentes tempos de armazenamento.

Dietas contendo silagem	Parâmetros					
	VCNF	kdCNF	L	VCF	kdCF	Vfinal
MM	273,6	0,056	3,37	117,5	0,016	391,0
SGH 30	220,8*	0,065	1,74*	146,4*	0,019*	367,2
SGH 60	180,1*	0,083*	1,93*	189,8*	0,024*	369,9
SGH 90	182,2*	0,091*	2,44*	194,9*	0,024*	377,0
SGH 120	194,5*	0,089*	3,27	179,8*	0,023*	374,3
SGHA 30	213,1*	0,071*	2,15*	161,8*	0,021*	374,8
SGHA 60	173,0*	0,084*	1,74*	177,2*	0,023*	350,2
SGHA 90	183,7*	0,087*	1,15*	192,8*	0,023*	376,5
SGHA 120	201,6*	0,082*	1,63*	174,3*	0,023*	376,0
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,058

\*diferem, pelo teste de Dunnet, das dietas contendo milho moído. VCNF: volume de gases provenientes dos carboidratos não fibrosos. kdCNF: taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos. L: tempo de colonização. VCF: volume de gases provenientes dos carboidratos fibrosos. kdCF: taxa de degradação dos carboidratos fibrosos. Vfinal: volume final de gases produzidos após 144 h. MM: dieta contendo milho moído. SGH: dieta contendo silagem de grãos de milho úmido sem o uso de aditivo em seus respectivos tempos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias), em substituição total do milho moído. SGHA: dieta contendo silagem de grãos de milho úmido com o uso de aditivo em seus respectivos tempos de armazenamento (30, 60, 90 e 120 dias), em substituição total do milho moído. (30, 60, 90 e 120 dias), em substituição total do milho moído.

O uso de dietas com o milho hidratado e ensilado apresentou maiores taxas de degradação dos carboidratos não fibrosos e fibrosos, efeito provavelmente advindo da desorganização das estruturas carboidratos pelos ácidos orgânicos e enzimas microbianas de fermentação na ensilagem do alimento.

Porém o volume de gases provenientes dos carboidratos fibrosos e não fibrosos, foram menores nas dietas com silagem em relação às dietas com milho apenas moído. Segundo Rooke e Hatfield (2003), os açúcares solúveis dos alimentos são fermentados em ácidos orgânicos, principalmente láctico, durante o processo de fermentação. Esses ácidos têm pequena participação na fermentação de substratos no rúmen, quando comparados aos açúcares solúveis dos alimentos. Portanto, esse fato pode explicar a maior concentração de gases produzidos pelos carboidratos das dietas.

Bitencourt (2012) avaliou o efeito da substituição do milho moído e extrusado pela silagem de grãos de milho hidratados para vacas holandesas em lactação e concluiu que o uso dessa silagem apresentou tendência no aumento da digestibilidade de matéria orgânica. Além disso, a autora observou melhor aproveitamento do nitrogênio no rúmen aumentando a síntese de proteína microbiana e diminuindo o nitrogênio ureico do leite, o que sugere que menores concentrações de nitrogênio em forma de amônia passaram para a corrente sanguínea e para o leite.

Revisando sobre meta-análise de 102 artigos publicados sobre processamento do milho oferecido à vacas em lactação, Ferrareto et al. (2013) observaram que a relação entre a produção de leite e o consumo aumentou com o uso de milho ensilado, indicando menor consumo com igualitória produção, provavelmente devido à maior degradabilidade ruminal e digestibilidade total do amido nessas dietas. Na maioria dos trabalhos revisados é nítido o ganho em eficiência alimentar pela melhor fermentação ruminal do amido, até em relação com tratamentos caros e dispendiosos como a extrusão.

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 5), mostraram que houve degradação dos componentes do endosperma durante o tempo de armazenamento e que o uso de aditivo na ensilagem proporcionou a presença e contínua atividade dos microrganismos inoculados durante o tempo de fermentação. Na imagem é possível ver modificações e há sinais de degradação nos grânulos como *melting* (2), trincas (3), perfurações (4) e exocorrosões (5).

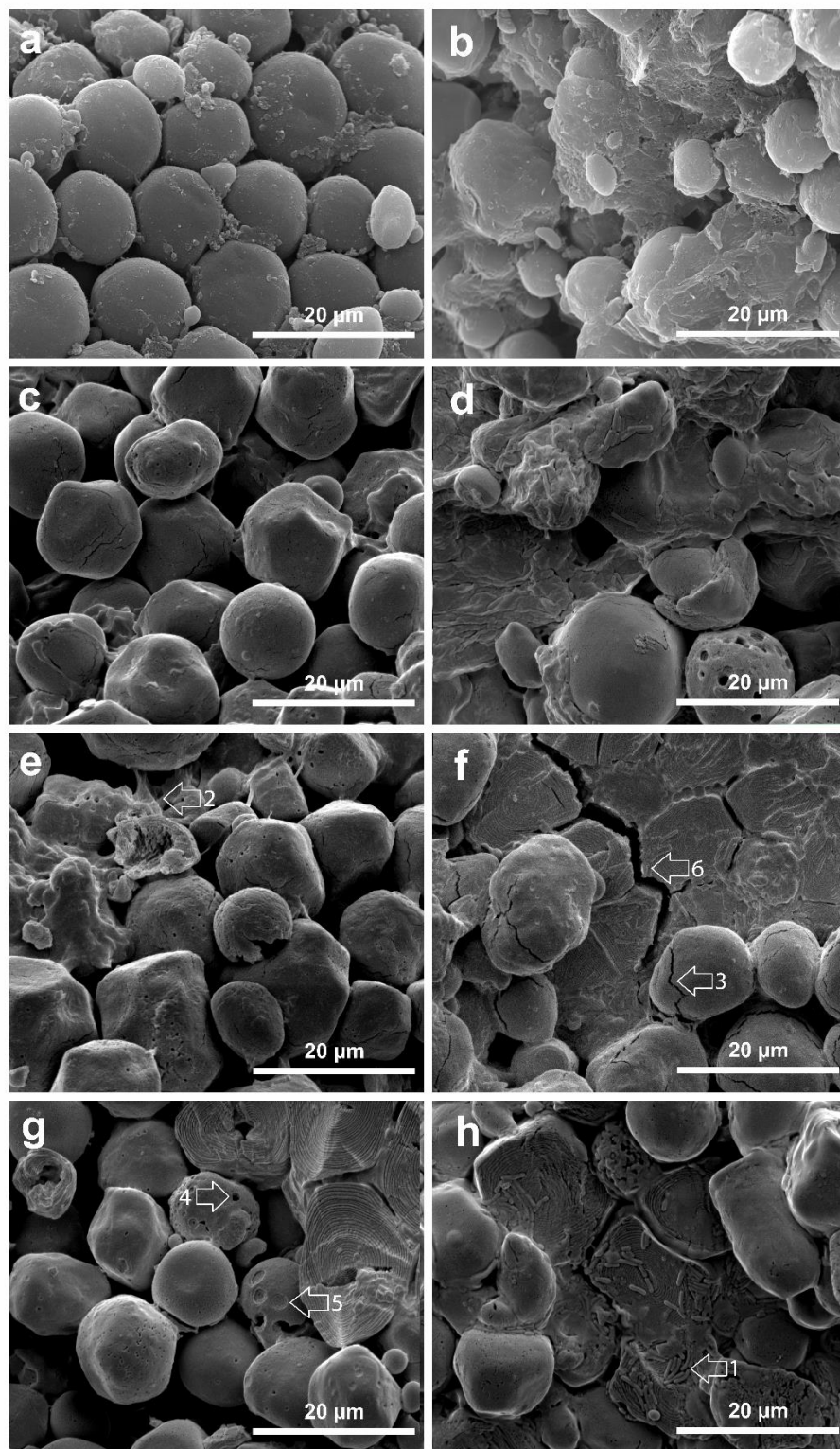


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura de silagens de grãos de milho hidratados. A: Silagem de grãos de milho hidratados sem inoculação tempo zero, B: Silagem de grãos de milho hidratados com inoculação tempo zero, C: Silagem de grãos de milho hidratados sem inoculação armazenado por 30 dias, D: Silagem de grãos de milho hidratados com inoculação armazenado por 30 dias, E: Silagem de grãos de milho hidratados sem inoculação armazenado por 60 dias, F: Silagem de grãos de milho hidratados com inoculação armazenado por 60 dias, G: Silagem de grãos de milho hidratados sem inoculação armazenado por 90 dias, H: Silagem de grãos de milho hidratados com inoculação armazenado por 90 dias. Microrganismos (1), *melting* (2), trincas (3), perfurações (4), excorrosões (5) e rachaduras (6).

Também é possível identificar a degradação da matriz proteica após longos períodos de armazenamento pelo menor nível de organização, rachaduras (6) e menor agrupamento dos grânulos, tanto nas amostras com uso de aditivo como nas amostras que não foram inoculadas.

A maior intensidade na degradação do amido e da matriz proteica do endosperma do milho das silagens inoculadas com aditivo, pode ser explicada pelo maior número de microrganismos e, conseqüentemente, maior atividade enzimática no alimento conservado. Além disso, o complexo de enzimas celulolíticas contido no aditivo pode ter aumentado o acesso das bactérias em locais do endosperma protegidos por estruturas mais rígidas.

#### **4 CONCLUSÃO**

Aditivos contendo microrganismos e enzimas, pode ser utilizado para ensilagem de grãos de milho hidratados, para melhorar a qualidade fermentativa e nutricional da silagem.

A ensilagem do milho por longos períodos pode alterar a estrutura do amido e conseqüentemente melhorar sua fermentação ruminal. Além disso, aditivos enzimo-microbianos podem potencializar esse efeito. Após 90 dias de armazenamento das silagens, houve tendência a estabilização da degradação ruminal da estrutura do amido nas silagens.

Em dietas de vacas leiteiras com aproximadamente 50% de milho, houve ganho na taxa de fermentação ruminal de carboidratos não fibrosos e até dos não fibrosos, apontando sinergia entre uma fonte de amido mais disponível para fermentação ruminal e os outros carboidratos da dieta.

## REFERÊNCIAS

- AMTS cattle Professional.** Free Trial, Agricultural Modeling & Training Systems. 2016.
- ANTUNES, R.C; RODRIGUEZ N.M; SALIBA, E.O.S. Metabolismo de carboidratos não estruturais. In: BERCHIELLI T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**, 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap 8.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, VA. Vol. I. 15th ed. 1990.
- ARCARI, M. A. et al. Effect of the ensiling time of hydrated ground corn on silage composition and *in situ* starch degradability. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 60-71, 2016.
- ARCURI, P. B; LOPES, F. C. F; CARNEIRO, J. C. Microbiologia Ruminal. In: BERCHIELLI T. T. et al. **Nutrição de ruminantes**, 2 ed. Jaboticabal: Funep, 2011. Cap 5.
- BASSO, F. C. Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 41, n.7, p. 1789-1794, 2012.
- BITENCOURT, L.L. Substituição de milho moído por milho reidratado e ensilado ou melaço de soja em vacas leiteiras. 2012. 130p. **Tese (Doutorado em Zootecnia)**, Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CAMPOS, F. P.; BOSE, M. L. V.; BOIN, C.; LANNA, D. P. D.; MORAIS, J. P. G. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão *in vitro*. 3. Desaparecimento da matéria seca e/ou FDN pela produção de gás. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 537-544, 2000.
- COUTO, S. R.; MOLDES, D.; SANROMÁN, A. Optimum stability conditions of pH and temperature for ligninase and manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Application to *in vitro* decolorization of Poly R-478 by MnP. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. Vol. 22, p. 607-612. 2006.
- DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2010.
- FERRARETTO, L.F., P.M. CRUMP, AND R.D. SHAVER. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**. Vol.96, n° 1, p. 533-540. 2013.

- FERRARETTO, L.F et al. Relationships between dry matter content, ensiling, ammonia-nitrogen, and ruminal in vitro starch digestibility in high-moisture corn samples. **Journal of Dairy Science**, Vol. 97, n. 5, p. 3221-3227, 2014.
- FERRARETTO, L. F; SHAVER, R. D; HOFFMAN, P. C. Effect of time of storage on ammonia nitrogen concentration and ruminal in vitro starch digestibility of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, vol. 96, n. 1, p.149, 2013.
- FREDIN, S. M et al. Fecal Starch as an indicator of total-tract starch digestibility by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Vol. 97, n° 3, p. 1862-1871.
- HOFFMAN, P. C. et al. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2465-2474, 2011.
- KUNG JUNIOR, L.; WINDLE, M. C.; WALKER, N. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1707-1712, 2014.
- McALLISTER, T. A. et al. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. **Journal of animal Science**. Vol. 72, p. 3004-3018, 1994.
- MILLER, Wj.; CLIFTON, CM.; FOWLER, P.R. & CAMERON, N.W. Ensiling characteristics of tift sudan and coastal bermuda grass. *J. Dairy Sci*, Baltimore, v. 49, p. 477-85, 1966.
- MIZUBUTI, Ivone Yurika et al. **Métodos Laboratoriais de Avaliação de Alimentos**. Londrina: EDUEL, 2009. 228p.
- NELSON, N.A. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biology Chemistry**, v.153, p.375-380, 1944.
- PAHLOW, G. et al. Microbiology of Ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage science and technology**. Wisconsin, 2003. p.31-93. Cap. 2.
- PEREIRA, M. N. et al. Silagem de milho reidratado na alimentação de gado leiteiro. **Informe agropecuário**. v. 34, n. 277, p.7-18, 2013.
- PLATT, M.W.; HADAR, Y.; CHET, I. Fungal activities involved in lignocellulose degradation by *Pleurotus*. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.150-154, 1984.
- R. CRAN mirror, version 3.4.2, 2017.
- ROOKE, J. A; HATFIELD, R. D. Biochemistry of Ensiling. In: BUXTON, D.R.; MUCK, R.E.; HARRISON, J.H. **Silage science and technology**. Wisconsin, 2003. p.95-139. Cap. 3.

- SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.
- SINGH, P.; JAIN, P; VERMA, R.; JAGADISH, R. S. Characterization of lignin peroxidase from *Paecilomyces* Species for decolorisation of pulp and papper mill effluent. **Jornal of Scientific & Industrial Research**. Vol. 75, p. 500-505. 2016.
- SNIFFEN, C.J.; O CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.J. A net carboydrate and protein sistem for evaluating cattle diets: II. Carboydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3562-3577, 1992.
- THEURER, C.B. et al. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.9, p.1950-1959, 1999.
- ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C. Método de determinação de granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves. **EMBRAPA – CNPSA (Comunicado Técnico)**. Dez. 1996. P. 1-5.

**ANEXOS**



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 28/2017

Londrina, 10 de Março de 2017.

Prezado Pesquisador,

Certificamos que o projeto intitulado "**Qualidade nutricional de silagens de grãos de milho reidratados em diferentes tempos de armazenagem**", protocolo CEUA nº **2823.2017.97**, sob a responsabilidade de **Valter Harry Bumbieris Junior**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **07/03/2017**.

O objetivo do projeto é avaliar a influência do tempo de fermentação e armazenagem sobre a qualidade nutricional do amido em silagens de grãos reidratados de milho. Para isso o animal será mantido em uma baia com piso, cocho e bebedouro de alvenaria por um período de dez dias, sendo alimentado ad libitum com rações de relação volumoso:concentrado de 55:45% diariamente. Diariamente haverá lavagem da cânula ruminal e ao final do período o animal será atado pela cabeça para coleta do conteúdo ruminal. Após a coleta o animal retornará ao manejo diário junto aos outros bovinos da fazenda escola. GI 1.

Vigência do Projeto	01/04/2017 a 10/04/2017
Espécie/linhagem	Bovino / Cruzado
Nº de animais	1
Peso/Idade	500 kg / 42 meses
Sexo	Macho
Origem	Fazenda Escola / UEL
Amostras a serem coletadas	Conteúdo ruminal

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente;

  
 Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes  
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.

**Prof. Dr. Valter Harry Bumbieris Junior**

Coordenador do Projeto

Departamento de Zootecnia / Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Direção da Fazenda Escola-/ UEL; Chefe do Departamento de Zootecnia e Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias



# ANIMAL FEED SCIENCE AND TECHNOLOGY

An International Scientific Journal Covering Research on Animal Nutrition, Feeding and Technology

## AUTHOR INFORMATION PACK

### TABLE OF CONTENTS

●	<b>Description</b>	<b>p.1</b>
●	<b>Audience</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Impact Factor</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Abstracting and Indexing</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Editorial Board</b>	<b>p.2</b>
●	<b>Guide for Authors</b>	<b>p.4</b>



ISSN: 0377-8401

### DESCRIPTION

*Animal Feed Science and Technology* is a unique journal publishing scientific papers of international interest focusing on **animal feeds** and their **feeding**.

Papers describing research on feed for ruminants and non-ruminants, including **poultry, horses, companion animals** and **aquatic animals**, are welcome.

The journal covers the following areas:

**Nutritive value** of feeds (e.g., assessment, improvement) Methods of **conserving** and **processing** feeds that affect their nutritional value **Agronomic** and **climatic** factors influencing the nutritive value of feeds **Utilization** of feeds and the improvement of such Metabolic, production, reproduction and **health responses**, as well as potential environmental impacts, of diet inputs and feed technologies (e.g., feeds, feed additives, feed components, mycotoxins) Mathematical models relating directly to **animal-feed interactions** Analytical and experimental methods for **feed evaluation** Environmental impacts of feed technologies in animal production

The journal does not encourage papers with emphasis on animal products, molecular biology, genetics or management, or the regulatory or legal aspects of feeds as well as animal production studies with a focus on animal nutrition that do not have a direct link to a feed or feed technology.

Manuscripts must be prepared in accordance with the journal's Guide for Authors.

Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the following editorials by the Editors-in-Chief:

Editorial on terminology and analytical methods ([Anim. Feed Sci. Technol. 118 \(2005\) 181-186](#))

Editorial on experimental design and statistical criteria ([Anim. Feed Sci. Technol. 129 \(2006\) 1-11](#))

Editorial on general suggestions and guidelines ([Anim. Feed Sci. Technol. 134 \(2007\) 181-188](#))

Editors comments on plagiarism ([Anim. Feed Sci. Technol. 154 \(2009\) 292-293](#))

Editorial on review techniques and responding on editorial comments ([Anim. Feed Sci. Technol. 155 \(2010\) 81-85](#))

Editorial on use of replicates in statistical analyses in papers submitted for publication in *Animal Feed Science and Technology* ([Anim. Feed Sci. Technol. 171 \(2012\) 1-5](#))

For an example of a sample manuscript [click here](#).

## AUDIENCE

---

Animal Scientists, Crop Scientists, Feed Manufacturers, Feed Additive Producers.

## IMPACT FACTOR

---

2016: 1.755 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2017

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences  
 Index Veterinarius  
 Herbage Abstracts  
 Nutrition Abstracts  
 Veterinary Bulletin  
 Biological Abstracts  
 Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**C. De Blas**, Departamento de Produccion Animal, E.T.S.I. Agronomos, Ciudad Universitaria, Madrid, Spain

### *Co-Editors*

**V. Mlambo**, North-West University, Mafikeng, South Africa

**A.K. Patra**, West Bengal University of Animal and Fishery Sciences, Belgachia, Kolkata, India

### *Statistical Advisors*

**J. Craigon**, Nottingham, UK

**J.G. Fadel**, Davis, CA, USA

**T.R. Famula**, Davis, CA, USA

**M.A. Ibáñez**, Madrid, Spain

### *Book Review Editor*

**G. Flachowsky**, Braunschweig, Germany

### *Senior Editorial Advisory Board*

**V. Bampidis**, Thessaloniki, Greece

**R. Campbell**, Willaston, SA, Australia

**J.W. Cone**, Wageningen, Netherlands

**J.A. Cuarón**, Colon Queuretaró, Mexico

**M. Fondevila**, Zaragoza, Spain

**K.M. Koenig**, Lethbridge, AB, Canada

**C.J. Lopez-Bote**, Madrid, Spain

**G.G. Mateos**, Madrid, Spain

**V.R. Ravindran**, Palmerston North, New Zealand

**M. Spanghero**, Udine, Italy

**K-H. Südekum**, Bonn, Germany

**M.T. Viana**, Ensenada, Mexico

### *Editorial Advisory Board*

**J.F. Aguilera**, Granada, Spain

**A.K. Bach**, Barcelona, Spain

**M.A. Bamikole**, Benin City, Nigeria

**H. Ben Salem**, Ariana, Tunisia

**A.R.J.B. Cabrita**, Vairão VC, Porto, Portugal

**S. Calsamiglia**, Barcelona, Spain

**D. Colombatto**, Buenos Aires, Argentina

**J. De Boever**, Melle, Belgium

**R. Dixon**, Rockhampton, QLD, Australia

**R.G. Elkin**, University Park, PA, USA

**E.H. Evans**, Bowmanville, ON, Canada

**L. Fiems**, Melle, Belgium  
**F. Grosjean**, Le Plessis Pâté, France  
**Y. Kotzamanis**, Athens, Greece  
**J. Kowalczyk**, Jabłonna, Poland  
**U. Krishnamoorthy**, Bangalore, India  
**J. Liu**, Hangzhou, China  
**J.A. Lowe**, Chale, Channel Islands, UK  
**J. Miron**, Bet Dagan, Israel  
**B. Mullan**, South Perth, WA, Australia  
**M.L. Nelson**, Pullman, WA, USA  
**F.N. Owens**, Johnston, Iowa, USA  
**H. Petit**, Sherbrooke, QC, Canada  
**R. Pieper**, Berlin, Germany  
**J.F. Pérez**, Bellaterra, Barcelona, Spain  
**S.D. Rawles**, Stuttgart, AR, USA  
**M. Rinne**, Jokioinen, Finland  
**C. Rymer**, Reading, UK  
**P.H. Selle**, Camden, NSW, Australia  
**K. Shingfield**, Jokioinen, Finland  
**K.S. Swanson**, Urbana, IL, USA  
**J. Takahashi**, Obihiro, Japan  
**V. Vahjen**, Berlin, Germany  
**H. van Laar**  
**R.J. Wallace**, Aberdeen, UK  
**W. Yang**, Lethbridge, AB, Canada

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

#### *Types of article*

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

*Original Research Papers* should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

*Review Articles* should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

*Book Reviews* will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Professor G. Flachowsky  
Federal Research Centre of Agriculture  
Institute of Animal Nutrition  
Bundesallee 50  
D-38116 Braunschweig  
Germany

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturers guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, wherein this information is not disclosed.

Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites.

Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement, may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

#### *Contact details for submission*

For queries concerning the submission process or journal procedures please visit the [Elsevier Support Center](#). Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## **BEFORE YOU BEGIN**

### ***Ethics in publishing***

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### ***Human and animal rights***

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

### ***Declaration of interest***

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### ***Submission declaration and verification***

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was

carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### **Author rights**

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

#### *Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

#### *Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### **Subscription**

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

### **Open access**

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

#### *Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2600**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

#### *Elsevier Publishing Campus*

The Elsevier Publishing Campus ([www.publishingcampus.com](http://www.publishingcampus.com)) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit.

Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editors-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/ANIFEE>.

### *Referees*

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our [Support site](#). Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## **PREPARATION**

### **Peer review**

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses.

### **Article Structure**

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

### *Material and methods*

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

### *Results*

Results should be clear and concise.

### **Discussion**

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

#### **Abstract**

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

#### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

#### *Highlights*

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

#### **Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

#### *Abbreviations*

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA) and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or  $\leq 1.0$ . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is *only* used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. m/L), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent.

Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca<sup>2+</sup>, not as Ca<sup>++</sup>. Isotope numbers should precede the symbols e.g. <sup>18</sup>O. The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>).

### *Math formulae*

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If  $0.10 > P > 0.05$ , then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in *Animal Feed Science and Technology* Vol. 129/1-2.

Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around \* and /. In probability expressions ( $P < 0.05$ ). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

### **Artwork**

#### *Electronic artwork*

##### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

##### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

##### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive**

**information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

### **Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

### **References**

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author(s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one co-author - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

#### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

### Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-feed-science-and-technology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

#### Reference style

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.

### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **RESEARCH DATA**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

#### *Data linking*

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### *Mendeley Data*

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### *Data statement*

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### *AudioSlides*

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### *Virtual Microscope*

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. [More information and examples](#). Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact [virtualmicroscope@elsevier.com](mailto:virtualmicroscope@elsevier.com) for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

### *Additional Information*

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.

## **AFTER ACCEPTANCE**

### *Online proof correction*

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

### **AUTHOR INQUIRIES**

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>