

**EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN SOBRE LA
CALIDAD DE SILAJES DE PLANTA ENTERA DE MAÍZ (*Zea
mays L.*) Y SORGO (*Sorghum bicolor L. Moench.*)**

Universidad Nacional de Villa María

IAP Ciencias Básicas y Aplicadas

Título: EFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE SILAJES DE PLANTA ENTERA DE MAÍZ (*Zea mays L.*) Y SORGO (*Sorghum bicolor L. Moench.*)

Autor: Oscar Alberto Caffaratti

Directora: Bióloga (MSc) Amanda Cora

Codirector: Ing. Agr. (MSc) Jorge Martínez Ferrer

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Tribunal evaluador (Art. Nº 15, Res. Nº 48/2000 del Consejo Superior)

_____ Nombre y apellido	_____ Firma
_____ Nombre y apellido	_____ Firma
_____ Nombre y apellido	_____ Firma

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Asesor
(Art. Nº 2, Res. 77/2006 del Consejo Directivo IAP Ciencias Básicas y Aplicadas)

_____ Nombre y apellido	_____ Firma
-----------------------------------	-----------------------

Lugar y fecha de aprobación: Villa María, 2016.

Universidad Nacional de Villa María

Instituto A. P. Ciencias Básicas y Aplicadas

**Trabajo Final de Grado para optar al título de
Ingeniero Agrónomo**

**EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN
SOBRE LA CALIDAD DE SILAJES DE PLANTA
ENTERA DE MAÍZ (*ZEA MAYS L.*) Y SORGO
(*SORGHUM BICOLOR L. MOENCH.*)**

AUTOR

Oscar Alberto Caffaratti

DIRECTORA

Bióloga. (MSc) Amanda Cora

CO-DIRECTOR

Ing. Agr. (MSc) Jorge Martínez Ferrer

Villa María - Córdoba

Septiembre 2016

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Clelia y Edgardo, mi Señora Ivana Fernández, y todos aquellos que me apoyaron incondicionalmente y fueron indispensables para cumplir este objetivo.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora, Bióloga (MSc) Amanda Cora y Co-Director, Ingeniero Agrónomo (MSc) Jorge Martínez Ferrer por el compromiso, apoyo y experiencia brindado durante el desarrollo del Trabajo Final de Grado.

Al personal de laboratorio por la ayuda y esfuerzo brindado durante el tiempo de muestreo y desarrollo de análisis.

A Limin Kung, Jr., Ph.D. por brindarme atención e información para la elaboración de este proyecto.

A todos los profesores, que formaron parte de esta etapa de mi vida y que con el aporte de cada uno de ellos fui formándome como persona y como profesional.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	1
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Proceso de ensilado	5
2.2 Fases del proceso de ensilado	5
2.2.1 Fase 1 o aeróbica	5
2.2.2 Fase 2 o anaeróbica	6
2.2.3 Fase 3 o estabilización.....	6
2.2.4 Fase 4 o Extracción y suministro	7
2.3 Factores a tener en cuenta para lograr un silaje de calidad.....	7
2.3.1 Madurez y humedad	7
2.3.2 Momento óptimo de picado	8
2.3.3 Tamaño y uniformidad de picado.....	9
2.3.4 Altura de corte.....	9
2.3.5 Compactación y densidad.....	10
2.3.6 Contenido de granos y su efecto en la densidad	11
2.3.7 Porosidad del ensilado.....	11
2.4 Pérdidas en el proceso de ensilado	12
2.4.1 Pérdidas en el campo	12
2.4.2 Pérdidas por respiración	12
2.4.3 Pérdidas por fermentación	13
2.4.4 Pérdidas por efluentes	13
2.5 Diagnóstico de la calidad y del valor nutritivo de los forrajes conservados.....	14
2.5.1 Parámetros relacionados al procesamiento y conservación del forraje.....	14
2.5.2 Parámetros relacionados con la composición química	15

2.5.3 Parámetros relacionados con la digestibilidad (análisis biológicos)....	16
2.6 Constitución y composición de los granos de sorgo y maíz.....	18
2.7 Interacción almidón – proteína en granos de sorgo y maíz.....	23
2.7.1 Digestibilidad del almidón	25
2.7.2 Efecto del procesado del grano	26
2.7.3 Efecto del tiempo de ensilado sobre la disponibilidad de almidón	26
2.7.4 Efecto de la adición de proteasas al silaje	28
3 HIPÓTESIS	31
4 OBJETIVO.....	32
4.1 Objetivo general.....	32
4.2 Objetivos específicos	32
5 MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 Ubicación del Experimento	33
5.2 Materiales	33
5.3 Metodología	34
5.4 Variables.....	37
5.5 Diseño experimental y análisis estadístico	37
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7 CONCLUSIONES	46
8 CONSIDERACIONES FINALES.....	47
9 BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopía de barrido electrónico de gránulos de almidón en maíz: A) gránulos de ALM fuertemente incrustados en la matriz de proteínas de prolaminas, (Gibbon, 2003, citado por Hoffman *et al.*, 2015).. 24

Figura 2. Microscopía de barrido electrónico de gránulos de almidón en maíz: B) gránulos de almidón en maíz opaco con un nivel de encapsulación menor en la matriz proteica (Gibbon, 2003, citado por Hoffman *et al.*, 2015) 25

Figura 3. Imagen microscópica de barrido electrónico. Efecto del proceso de ensilaje luego de 240 días de confeccionado (Hoffman *et al.*, 2011)..... 27

Figura 4. Producción de gas en ensilaje de sorgo para cada fecha de apertura, período y horas de muestreo 42

Figura 5. Producción de gas en ensilaje de maíz para cada fecha de apertura, período y horas de muestreo 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características físicas; químicas y biológicas que determinan la calidad del ensilaje de sorgo conservado a lo largo de un año	38
Tabla 2. Características físicas; químicas y biológicas que determinan la calidad del ensilaje de maíz conservado a lo largo de un año	40
Tabla 3. Parámetros del modelo no lineal desarrollado por France <i>et al.</i> , (1993) que describen la cinética de producción de gas, del ensilaje de sorgo a lo largo de un año de conservación	41
Tabla 4. Parámetros del modelo no lineal desarrollado por France <i>et al.</i> , (1993) que describen la cinética de producción de gas, del ensilaje de maíz a lo largo de un año de conservación	43

ÍNDICE DE SIGLAS O ABREVIATURAS

ALM: Almidón.

FDA: Fibra de detergente ácido.

FDN: Fibra de detergente neutra.

LDA: Lignina de detergente ácido.

MO: Materia orgánica.

MS: Materia seca.

NIDA: Nitrógeno insoluble en detergente ácido.

N-NH₃: Nitrógeno amoniacal.

PB: Proteína bruta.

DMS: Digestibilidad de la materia seca.

FDN_{ef}: Fibra detergente neutro efectiva.

Cz: Ceniza.

EE: Extracto etéreo.

DIVMS: Digestibilidad in vitro de la materia seca.

PDR: Proteína degradable en rumen.

PNDR: Proteína no degradable en rumen.

PG: Producción de gas.

DIVMO: digestibilidad in vitro de la materia orgánica.

EFFECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE SILAJES DE PLANTA ENTERA DE MAÍZ (*Zea mays L.*) Y SORGO (*Sorghum bicolor L. Moench.*)

Autor: Oscar A. Caffaratti

Directora: Bióloga (MSc) Amanda Cora

Codirector: Ing. Agr. (MSc) Jorge Martínez Ferrer

RESUMEN

La intensificación de los sistemas ganaderos ha llevado a que los forrajes conservados tengan un rol importante en la alimentación del ganado. Bajo este contexto, es de fundamental importancia contar con reservas forrajeras de alta calidad. El contenido de granos es uno de los factores que hacen a la calidad de un silaje siendo el almidón (ALM) el componente principal de los mismos, el cual se encuentra envuelto en una densa matriz proteica formada en su mayoría por prolaminas. El tiempo de ensilado afecta dicha capa proteica dejando más expuesto el ALM a la digestión enzimática por parte de las bacterias ruminales. Con el objetivo de evaluar la calidad de los silajes de planta entera de maíz y sorgo en función al tiempo de ensilado, se confeccionaron 18 microsilos de cada material, los cuales fueron abiertos a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de confeccionado para su muestreo y evaluación. En fresco se determinó amoníaco y pH; se realizó el contenido de materia seca (MS), y en base seca se analizó materia orgánica (MO), proteína bruta (PB), fibra de detergente neutro (FDN), fibra de detergente ácido (FDA), lignina de detergente ácido (LDA), nitrógeno insoluble de detergente ácido (NIDA), ALM y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) y los parámetros que describen el patrón de fermentación ruminal de los materiales. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas en nitrógeno amoniacal (N-NH₃) porcentaje del nitrógeno total (%/Nt) dando indicios de actividad proteolítica. También se encontraron cambios en la capacidad fermentativa, los cuales a pesar de ser casi imperceptibles, apoyan la teoría de un proceso proteolítico activo durante la fase estable de un silaje, no siendo así para los valores de ALM. Si bien los resultados obtenidos no fueron los esperados en relación a la magnitud de los cambios

observados, se pudo verificar que el tiempo de ensilado afecta la calidad siempre que se respeten las buenas pautas de confección de un silaje.

Palabras clave: silaje, almidón, prolamina, kafirina, zeina.

EFEECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE SILAJES DE PLANTA ENTERA DE MAÍZ (*Zea mays L.*) Y SORGO (*Sorghum bicolor L. Moench.*)

Autor: Oscar A. Caffaratti

Directora: Bióloga (MSc) Amanda Cora

Codirector: Ing. Agr. (MSc) Jorge Martínez Ferrer

ABSTRACT

The intensification of livestock systems has led to consider conserved forages as a very relevant animal feed. In this context, it is critical to have high-quality forage reserves. The grain content is one of the factors that influences silage quality, being starch the main component of kernels, which is enveloped in a dense protein matrix conformed mainly by prolamins. Time since silage confection affects integrity of this protein layer, exposing starch to enzymatic digestion by the rumen bacteria. In order to assess changes in the quality of corn and sorghum whole plant silage, 18 microsilos of each material were prepared, which were opened at 2, 4, 6, 8, 10 and 12 months from confection for sampling and evaluation. Over fresh material, ammonia, pH, and dry matter (DM) content (%) were determined. Organic matter, Crude protein, Neutral detergent fiber, acid detergent fiber, acid detergent lignin, acid detergent insoluble nitrogen and starch contents were determined on a DM basis, Organic matter in vitro digestibility and the parameters that describe the pattern of ruminal fermentation were also studied. Statistically significant differences in N-NH₃ (% / TN) were detected supporting the idea that some proteolytic activity has occurred. Changes were also found in the fermentative capacity, despite being almost imperceptible, supporting the theory that an active proteolytic process during the stable phase of silage was going on, although these were not evident for starch. While the results were not of the magnitude as expected, it was verified that the time since silage confection affects the nutritive value of the conserved forage, provided good silage making practices are respected.

Keywords: silage, starch, prolamin, kafirin, zein.

EFEECTO DEL TIEMPO DE MADURACIÓN SOBRE LA CALIDAD DE SILAJES DE PLANTA ENTERA DE MAÍZ (*Zea mays L.*) Y SORGO (*Sorghum bicolor L. Moench.*)

Autor: Oscar A. Caffaratti

Directora: Bióloga (MSc) Amanda Cora

Codirector: Ing. Agr. (MSc) Jorge Martínez Ferrer

1 INTRODUCCIÓN

La producción animal en el mundo ha evolucionado hacia sistemas en los cuales la búsqueda de eficiencia es el objetivo común. La tierra ha dejado de ser productora de pasto para pasar a ser productora de forrajes y granos que terminan transformados principalmente en carne o leche dentro de un sistema ganadero (Abdelhadi, 2007).

La intensificación de sistemas ganaderos es en parte consecuencia de la pérdida de más de 10 millones de hectáreas a nivel nacional, que anteriormente fueron destinados a sistemas ganaderos de base pastoril, y que actualmente se han volcado a sistemas agrícolas. Esto, sumado al hecho de mantener aproximadamente el mismo stock bovino para producción de carne y de leche, ha generado una mayor utilización de las pasturas, y en muchos casos, hasta sobrepastoreo (Bertín, 2009, citado por Clemente *et al.*, 2012).

Simultáneamente, crecieron otras alternativas de alimentación del ganado, principalmente asociada al encierre a corral y el uso de otras fuentes de nutrientes distintas a los forrajes, principalmente concentrados y subproductos de otras actividades, tanto agrícolas como agroindustriales (Clemente *et al.*, 2012).

El actual avance de la intensificación de los sistemas de producción de leche en Argentina, hace que cada vez se deba ser más eficiente en la producción de recursos forrajeros por unidad de superficie. Para ello, una de las técnicas más implementadas, y en actual expansión, es el silaje de planta entera de diferentes cultivos (Clemente *et al.*, 2012).

Ante la necesidad de estabilizar la oferta de alimentos y la producción animal, las reservas forrajeras constituyen un eje fundamental del sistema. Contar con una reserva de calidad, garantiza estabilidad productiva y financiera, y disminuye los riesgos ante contingencias climáticas. En este contexto, los silajes correctamente confeccionados son fundamentales (Abdelhadi, 2007).

Dentro de los silajes, el principal protagonista en los procesos de intensificación ha sido el maíz. Pero en el proceso de desplazamiento de la ganadería a zonas con mayores restricciones edafo-climáticas, el principal cultivo, es el sorgo, debido a su mayor tolerancia a sequía (Clemente *et al.*, 2012).

La técnica del ensilaje, es un método de conservación de forrajes con alto contenido de humedad, cuyo éxito depende del logro de adecuadas condiciones de acidez para estabilizar el material y de la preservación de las condiciones de anaerobiosis (Jaurena, 2008).

Este tipo de reserva permite el desarrollo de un complejo grupo de microorganismos anaerobiofícos. El objetivo es conservar el valor nutritivo de la planta verde, a través de distintos procesos químicos y biológicos que se producen en el material ensilado. En la medida que estas fases, químicas y biológicas, se desarrollen en condiciones óptimas de trabajo, se podrá obtener un material ensilado cuya calidad es ligeramente inferior al cultivo verde antes de ensilar (Fernández Mayer, 1999).

Es importante aclarar que no existe ningún tipo de conservación que mejore la calidad del forraje verde original, de ahí la importancia de cuidar todo el proceso enzimático-fermentativo con el objetivo de alcanzar un silaje de alta calidad (Fernández Mayer, 1999).

Dentro de los factores que hacen a la calidad de un silaje, se encuentra el contenido de granos, siendo este uno de los componentes de mayor calidad debido a su concentración energética, comprendiendo en situaciones normales entre el 40-50% de la materia seca total (Van Olphen *et al.*, 2004).

Montiel y Elizalde (2004) y Hallada (2009), exponen que, el principal componente energético de los granos de maíz y sorgo es el almidón (ALM)

que se encuentra en el endospermo de las semillas y que existen factores físicos y químicos que afectan la disponibilidad del ALM para que luego sea hidrolizado por las enzimas presentes a nivel ruminal e intestinal de un rumiante. La accesibilidad a los gránulos de ALM depende de la composición química y el grosor de la pared de las células que los recubren, y de su asociación intracelular con proteínas que pueden impedir o disminuir el ataque enzimático

Los gránulos de ALM en los endospermos periféricos y córneos están rodeados por cuerpos proteicos y se encuentran embebidos en una densa y continua matriz proteica formada principalmente por prolaminas, denominadas kafirinas en sorgo y zeínas en maíz. Éstas, al ser insolubles en el licor ruminal, afectarían en forma negativa la disponibilidad de ALM para la degradación bacteriana (Montiel y Elizalde, 2004).

La naturaleza y la composición química de la matriz proteica tienen un profundo efecto sobre las características físicas del endospermo y la exposición de los gránulos de ALM a la digestión enzimática. Dado que el sorgo tiene en general una mayor proporción de endospermo periférico que el maíz, su calidad proteica es menor. Es por ello que, cualquier factor químico (proceso de ensilado) o físico que afecte esta matriz proteica como, por ejemplo el procesado del grano, hará que aumente la utilización del ALM por parte del animal (Montiel y Elizalde, 2004; Hallada, 2009).

Hallada (2009) observó que ante la apertura de silajes de la nueva temporada, química y organolépticamente iguales a los anteriores, la producción de leche bovina disminuía con respecto a los valores obtenidos previamente.

Para probar la hipótesis de que los nutrientes digestibles en maíz para ensilaje cambian con el tiempo de ensilado, en particular el ALM, y la fibra, se diseñó un estudio en el sureste de Minnesota. El estudio demostró que la calidad del forraje y la energía variaban. Todas las digestibilidades medidas, mostraron una mejora con el paso del tiempo de ensilado. En general se observó una variación mensual de 0,5-0,7% en la digestibilidad de la materia seca (DMS) a 12 y 30 horas respectivamente. Luego de seis meses de ensilaje, los valores de DMS a 12 y 30 horas, digestibilidad del ALM a 12

horas y de digestibilidad total del ALM en el tracto detuvieron su incremento y resultaron similares. En cambio, la digestibilidad de la FDN continuó mejorando hasta el final del ciclo, pasando de 36,6% a los 5 meses a 39,2% a los 11 meses (Hallada, 2009).

Los híbridos que contienen menos prolaminas pueden tener una mejor digestibilidad en los primeros meses del ensilaje en comparación con el ensilado de híbridos que contienen más prolaminas que necesitan ser solubilizadas. Con el tiempo de ensilado, esta proteína (prolamina) se disuelve debido a la fermentación ácida, y el endospermo se vuelve más soluble (digestible), y así pueden manifestarse cambios en la digestibilidad del ALM (Hallada, 2009).

Tener una comprensión más completa de cómo cambian los nutrientes con el tiempo de ensilado puede ayudar a mejorar la formulación de raciones y, por lo tanto, los márgenes de una explotación agropecuaria (Hallada, 2009).

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Proceso de ensilado

El ensilaje es una técnica de preservación de forraje que se logra por medio de una fermentación láctica espontánea bajo condiciones anaeróbicas. Las bacterias epifíticas de ácido láctico fermentan los carbohidratos hidrosolubles del forraje produciendo ácido láctico y en menor cantidad, ácido acético. Al generarse estos ácidos, el pH del material ensilado baja a un nivel que inhibe la presencia de microorganismos que inducen la putrefacción (Weinberg *et al*, 1996).

2.2 Fases del proceso de ensilado

Una vez que el material fresco ha sido almacenado, compactado y cubierto para excluir el aire, el proceso del ensilaje se puede dividir en cuatro etapas (Weinberg *et al*, 1996).

2.2.1 Fase 1 o aeróbica

La fase aeróbica comienza con el picado y continúa hasta que el oxígeno es desplazado del silo, en un período muy corto posterior a la compactación. Durante este estado, los azúcares de la planta recién picada se descomponen en dióxido de carbono y agua, liberando calor en el proceso conocido como respiración (Bragachini *et al.*, 2008).

Microorganismos aeróbicos como los hongos, levaduras y bacterias, presentes en el forraje picado utilizan también los hidratos de carbono durante esta fase, como principal fuente de energía para la respiración (Bragachini *et al.*, 2008).

Las temperaturas pueden subir de 4 a 6 °C por encima de la temperatura ambiente en el momento de ensilado. Si estas superan este nivel, puede ser un indicador de procesos respiratorios excesivos (Bragachini *et al.*, 2008).

La fase 1 finaliza cuando el oxígeno ha sido eliminado en su totalidad de la masa del silo. Esta disminuye la calidad del silo por lo que debería durar lo menos posible. Bajo condiciones ideales de cultivo y almacenaje,

esto debería ocurrir en no más de 2 horas, mientras que con mal manejo, por ejemplo picado del cultivo demasiado seco, pobre compactación, picado largo, llenado lento, etc., esta fase puede durar varios días, con la consiguiente pérdida de calidad (Bragachini *et al.*, 2008).

2.2.2 Fase 2 o anaeróbica

Durante la misma una sucesión de diferentes poblaciones de bacterias fermentan los azúcares y son convertidos principalmente en ácido láctico, pero también en ácido acético, etanol, CO₂ y algunos otros productos (Bragachini *et al.*, 2008).

La producción de ácidos baja el pH del material ensilado, lo que inhibe el desarrollo de otros microorganismos (Bragachini *et al.*, 2008).

Una vez que comienza la fase 2, ocurre una fermentación anaeróbica, produciéndose el crecimiento y desarrollo de bacterias productoras de ácido acético (Bragachini *et al.*, 2008).

Cuando el pH de la masa ensilada cae por debajo de 5, la población de las bacterias acéticas disminuye, ya que este nivel de acidez inhibe su crecimiento. Esto señala la finalización de la fase, que en condiciones normales ocurre dentro de las 24 a 72 horas de iniciado el proceso (Bragachini *et al.*, 2008).

No es conveniente que este proceso de fermentación acética se prolongue, ya que las bacterias acetogénicas o promotoras de la formación de ácido acético consumen alrededor del 36% de hidratos de carbono para la producción de ácido, reduciendo el nivel energético de los silos producidos (Bragachini *et al.*, 2008).

2.2.3 Fase 3 o estabilización

Es una fase de transición donde las bacterias acéticas dan lugar a las productoras de ácido láctico, las que aumentan su población debido al continuo descenso de pH (Bragachini *et al.*, 2008).

El pH final dependerá fundamentalmente del tipo de forraje ensilado y de las condiciones de confección y almacenaje (Bragachini *et al.*, 2008).

Cuando se trabaja con materiales de alto contenido proteico como las pasturas, se dificulta el descenso del pH, por el efecto buffer ejercido por el

nitrógeno, pudiendo alcanzar un pH final de alrededor 4,5 mientras que en el maíz ese valor puede llegar a 3,8 – 4 (Bragachini *et al.*, 2008).

Forrajes ensilados con niveles de humedad superiores al 70%, pueden sufrir fermentaciones butíricas generadas por bacterias del género *Clostridium* presentes en el suelo, dando como resultado un silaje de color oscuro con olor a rancio, y pH superior a 5 (Bragachini *et al.*, 2008).

La fermentación láctica no sólo estabiliza el silo con el pH más bajo, sino que es la más eficiente en el aprovechamiento de los azúcares disponibles en las células del forraje (Bragachini *et al.*, 2008).

2.2.4 Fase 4 o Extracción y suministro

Esta fase comienza una vez que el silo es abierto y finaliza cuando todo el silaje es consumido (Bragachini *et al.*, 2008).

El deterioro aeróbico ocurre cuando el material ensilado es expuesto al aire, cambiando la composición química, pH y temperatura, alterándose tanto la calidad como la cantidad de forraje. Los hongos, levaduras y bacterias presentes en el silo, consumen los hidratos de carbono del forraje y los productos finales de la fermentación, produciendo CO₂, agua y calor. Como resultado de estos procesos existe un aumento de la temperatura y el pH, pérdida de nutrientes e incremento en los porcentajes de FDN y FDA. El forraje deteriorado por acción del oxígeno, se presenta normalmente descolorido y conteniendo toxinas las cuales pueden provocar serios trastornos, dependiendo del nivel de consumo (Cattani, 2015).

2.3 Factores a tener en cuenta para lograr un silaje de calidad

Existen 3 factores que interactúan entre sí y determinan la calidad final del ensilado:

- Contenido de humedad de la planta al momento del picado.
- Momento de picado.
- Tamaño y uniformidad de picado.

2.3.1 Madurez y humedad

El estado de madurez óptimo asegura un elevado contenido de azúcares disponibles para las bacterias y un máximo valor nutricional para el ganado (Bragachini *et al.*, 2008).

La madurez tiene un alto impacto en el contenido de humedad de cultivos en los que no se realiza pre-marchitado como es el caso del silaje de maíz o sorgo, donde el contenido de humedad óptimo se encuentra comprendido entre el 60-70%. Valores superiores a los mencionados pueden derivar en una fermentación butírica o en un exceso de pérdidas por lixiviación de azúcares, de igual manera niveles inferiores de humedad pueden retrasar e incluso impedir que la fermentación se lleve a cabo (Bragachini *et al.*, 2001).

El contenido de MS del forraje resulta esencial para asegurar que la fermentación se realice en forma correcta, además de facilitar la eliminación del oxígeno durante el proceso de llenado y compactado (Cattani, 2015).

2.3.2 Momento óptimo de picado

El momento ideal para el picado está determinado en función del tipo de corta-picadora a usar. Con los equipos antiguos (picado simple) se debe picar en estado lechoso, mientras que con equipos modernos (picado fino o ultra picado) el picado debe realizarse cuando el grano alcanza el estado de madurez fisiológica. En estas condiciones, se aseguraría un mejor llenado del grano (mayor % de ALM). El momento óptimo de picado para el caso del maíz se determina en función de la línea de leche, línea que separa el endosperma duro (almidonoso) del endosperma líquido (lechoso). Esta línea de leche debiera ubicarse entre 1/4 a 1/2 del grano, es decir 1/4 a 1/2 del grano es líquido y el resto es sólido (Fernández Mayer, 1999).

Generalizando, se puede decir que para pasar de grano lechoso a 1/2 línea de leche demora 11 días, de 1/2 a 1/4 línea de leche tarda 6 días y de 1/4 línea de leche a grano duro o sin leche 7 días. Cuando se alcanza la madurez fisiológica, el grano contiene entre 62-65% de MS; la espiga entre 55-60% y la planta entera entre 32-38% de MS. Cualquier variación en el peso después de este período se debe a una pérdida de humedad (Fernández Mayer, 1999).

En caso de que esto no ocurra y el contenido de grano sea inferior al 30% del total de MS del cultivo, el momento de picado deberá determinarse según el estado de madurez de la planta, picando cuando el tercio inferior se encuentre seco, asegurando un porcentaje de humedad adecuado para la

compactación y fermentación y un contenido de fibra aceptable para la confección de silajes (Bragachini *et al.*, 2001).

2.3.3 Tamaño y uniformidad de picado

El tamaño de picado debe estar definido por varios factores tales como, el uso eficiente de la maquinaria, la facilidad de la compactación, el aprovechamiento de la energía aportada por el grano, la movilidad ruminal y el correcto aprovechamiento del forraje en los comederos (Bragachini *et al.*, 2008).

Es por ello que se define como correcto, un picado aproximado de 1,5 cm, con el grano bien partido, que tenga entre un 7-12 % de partículas de más de 2,5 cm pero nunca mayor a 8-10 cm (Bragachini *et al.*, 2008).

Este tamaño permite realizar un buen compactado, ya que se debe tener presente que al desparramar de manera uniforme el material picado fino, la eliminación del aire se simplifica.

Además, permite que la tasa de pasaje a nivel ruminal sea elevada, favoreciendo el consumo y por consiguiente los niveles productivos, sin alterar significativamente la digestibilidad de todo el material, hecho que normalmente ocurre cuando el tamaño de picado es demasiado pequeño (Mayer Fernández, 2011).

2.3.4 Altura de corte

La altura de corte va a depender en cierta medida de la altura de la planta que se vaya a picar, considerando que si se trata de un sorgo de bajo porte, será menor que en un maíz de los denominados tropicales que tienen una altura considerable (Bragachini *et al.*, 2008).

Esto tiene varias explicaciones y fundamentos que se detallan a continuación.

En primer lugar, teniendo en cuenta la cantidad de forraje que se va a cosechar, no tiene sentido incorporar al silo la porción de forraje que contienen mayor contenido de agua y de fibra, considerando que la parte basal de las plantas de maíz contienen hasta un 80% de FDN, lo que ayudaría a deprimir el consumo de ese forraje (Bragachini *et al.*, 2008).

Por otra parte, la mayor cantidad de potasio se halla alojado en los primeros 30 cm del tallo y dejando esa porción en el lote se devuelve

fertilidad, además de agregar cobertura a los 5 cm de tallo que normalmente se dejan (Bragachini *et al.*, 2008).

El último factor a considerar, es que la primera hoja y la porción basal del tallo están muy contaminadas con tierra y cosechando esa porción de la planta se incorpora tierra al silo, con el riesgo de favorecer una fermentación indeseable del tipo butírica (Bragachini *et al.*, 2008).

2.3.5 Compactación y densidad

Las técnicas de compactado dependerán del tipo de silo, pero si se cuenta con tractores con caja inversora, se va a ser más eficiente en el pisado, ya que no será necesario "bajar del silo" para dar la vuelta, ni girar sobre él (Bragachini *et al.*, 2008).

Cuando se gira en ángulo muy cerrado sobre el silo, por lo general en algún momento los neumáticos arrastran material, generando también puntos flojos en la masa ensilada (Bragachini *et al.*, 2008).

Trabajando en forma correcta, las pérdidas causadas por respiración son mínimas en silos que estén bien compactados y tapados, lo cual favorecerá crear condiciones de fermentación anaeróbica lo más rápido posible (Bragachini *et al.*, 2008).

Una vez finalizada la compactación, las bacterias aeróbicas continúan respirando hasta que se consume todo el oxígeno del medio. La tasa de respiración está regulada por la temperatura, acelerándose los procesos respiratorios a medida que ésta aumenta, hasta llegar a los 30°C (Bragachini *et al.*, 2008).

Una alta densidad es importante para aumentar la capacidad de almacenaje y reducir la porosidad, en función de disminuir las pérdidas por oxidación y preservar las condiciones de alto valor alimenticio del material. El grado de compactación depende de factores tales como el estadio de madurez del cultivo, tamaño de picado, espesor de la capa de material esparcido, peso de los tractores usados para compactar, etc. El valor mínimo deseable es de 240 kgMS/m³ (Royo *et al.*, 2012).

Estudios realizados en la Universidad de Wisconsin, respecto a silos aéreos, han descubierto que los factores que tienen grandes efectos en densidades de silos bunker y puente son el índice de entrega de forraje en el

silos, el contenido de MS en la cosecha, la altura del silo, el promedio de peso de los tractores de compactado, el número de tractores de compactado usados, el grosor de las capas de compactado y el tiempo de compactado. Muchos de estos factores pueden ser manejados por los productores de silaje; sin embargo, muchos no son tenidos en cuenta (Holmes *et al.*, 1999).

Una recomendación a realizar es reducir el grosor de cada capa del ensilaje que es compactada, esto permitirá aumentar densidades. Una capa de 15 cm se compacta más efectivamente que una capa de 30 cm. Una mala distribución del material a ensilar crea capas desiguales de 15-60 cm a lo largo del silo. El índice de cosecha, la experiencia de operador y el equipo de compactado usado afectará el manejo del grosor de capa (Holmes *et al.*, 1999).

El nivel superior de un bunker es siempre el menos compacto. Además esta área es la más expuesta al escurrimiento y al oxígeno. El tiempo extra invertido en compactar la superficie mejorará densidades en esta área (Holmes *et al.*, 1999).

2.3.6 Contenido de granos y su efecto en la densidad

Estudios realizados en Canadá exponen que la cantidad de grano presente en el material ensilado presenta una relación directa con la densidad del mismo, ya que a mayor porcentaje de grano en función a la masa ensilada, la densidad del silaje se incrementa (D'Amours *et al.*, 2005).

2.3.7 Porosidad del ensilado

Según Holmes y Muck (2008), hay 3 fuerzas que pueden hacer mover el gas dentro de la masa del ensilaje a través de los poros. La primera es la difusión que se genera sobre las caras expuestas, especialmente en la que se esté utilizando a la hora de alimentar ya que ésta presenta aproximadamente un 20% de contenido de oxígeno, mientras que en lo profundo del ensilaje es 0%. Así el oxígeno se mueve de la mayor concentración a la menor por difusión a través de los poros abiertos. Esto ocurre en todos los silajes, siendo mayor o menor el caudal de oxígeno de acuerdo a la cantidad de poros de la pared.

Otro factor es la gravedad, que puede mover fluidos a través de los poros como por ejemplo el agua en el perfil del suelo. El CO₂ que es más

pesado que el oxígeno se asienta y permite la entrada de aire el cual activa los procesos degradativos (Holmes *et al.*, 2008).

Finalmente el viento que impacta sobre las paredes del ensilado puede generar desplazamiento de gases por lo tanto las paredes de un silo bunker o el tapado de los silajes generan una protección sobre este factor (Holmes *et al.*, 2008).

2.4 Pérdidas en el proceso de ensilado

2.4.1 Pérdidas en el campo

Siempre que se trabaje con maquinaria de precisión y con cabezal recolectores adecuados, las perdidas en el campo serán reducidas (Bragachini *et al.*, 2008).

Si bien la gran mayoría de la superficie de silaje se realiza con máquinas autopropulsadas, existen "nuevas zonas", donde estas máquinas aún no llegaron o bien están alejadas, por lo que aún se trabaja con maquinaria de arrastre (Bragachini *et al.*, 2008).

Un punto a tener en cuenta, cuando se usan máquinas de arrastre pequeñas, es que los cabezales recolectores en hileras corten el forraje apenas toman contacto con él (cuchillas de corte en la parte más externa del puntón), ya que de otra forma se corre el riesgo de tumbar plantas con pérdidas de MS o bien de arrancar plantas e incorporar material con restos de raíz y tierra que contamina el silaje producido (Bragachini *et al.*, 2008).

Cuando se trabaja con maquinaria autopropulsada, los riesgos de pérdida de MS se minimizan, debido a que principalmente los cabezales de corte evolucionaron de tal manera que prácticamente no tienen limitantes (Bragachini *et al.*, 2008).

Dentro de las pérdidas de material se debe tener especial cuidado en los cambios de camiones, para que exista una buena sincronización entre el operario de la picadora y el chofer de los camiones, a los fines de tratar de evitar lo más posible que se tire forraje picado al suelo (Bragachini *et al.*, 2008).

2.4.2 Pérdidas por respiración

Dependen directamente de tres factores:

- La distancia entre el lote a picar y el lugar de confección del ensilado (Bragachini *et al.*, 2008).
- La frecuencia de llenado, que depende de la capacidad de trabajo de la picadora y la frecuencia con que se cubren las sucesivas capas con material compactado (Bragachini *et al.*, 2008).
- La velocidad con que se quite el oxígeno del material a través del compactado (Bragachini *et al.*, 2008).

2.4.3 Pérdidas por fermentación

Se producen por la actividad de microorganismos que se desarrollan en condiciones anaeróbicas. Las bacterias, ya sean lácticas, acéticas o butíricas, utilizan los azúcares simples del jugo celular transformándolos en ácidos orgánicos e inhibiendo cualquier actividad microbiana posterior, logrando así la conservación del material (Bragachini *et al.*, 2008).

Las bacterias ácido-lácticas pueden clasificarse en homo-lácticas y hetero-lácticas. Las primeras son más activas y eficientes en la producción de ácido láctico a partir de los azúcares, ya que no producen gas durante la fermentación, siendo nulas las pérdidas gaseosas durante este proceso. No así las hetero-lácticas, en las que el nivel de pérdidas producidas estaría en relación directa al material originario, ya sea glucosa a fructuosa (Bragachini *et al.*, 2008).

Existen condiciones, en las que los procesos fermentativos no son los descritos comúnmente, derivando en fermentaciones de tipo butíricas ocasionadas por varios factores, entre los que se destacan los clostridios. Los clostridios son promotores del ácido butírico y responsables de los silajes rancios, negros y de pH elevado. Incluso este tipo de fermentación puede provocar que los silajes sean tóxicos y causen enfermedades y hasta la muerte en los animales que los consumen (Bragachini *et al.*, 2008).

2.4.4 Pérdidas por efluentes

El volumen de pérdidas por efluentes depende del contenido de humedad del forraje, del tamaño de picado y de la forma y estructura del silo (Bragachini *et al.*, 2008).

Es importante que el material a ensilar posea alrededor del 65 - 70% de humedad y en algunos casos menos, como en los sorgos y los silajes de

pasturas, considerando que si este porcentaje es superior se perderá por lixiviación una gran cantidad de "jugos" con un contenido estimado del 6 - 8% de MS de alto valor nutritivo, como los azúcares y proteínas más solubles (Bragachini *et al.*, 2008).

2.5 Diagnóstico de la calidad y del valor nutritivo de los forrajes conservados

Los forrajes conservados (secos o húmedos) son recursos muy susceptibles al deterioro si las condiciones de preservación no son las adecuadas. La exposición de los materiales a la intemperie, la contaminación con hongos u otros materiales extraños y las fermentaciones indeseables podrían provocar daños irreversibles en la salud y el desempeño animal (Gallardo, 2007).

Por esta razón es de fundamental importancia el diagnóstico de la calidad y del valor nutritivo de los forrajes conservados. Para ello se utilizan tres tipos diferentes de análisis (Gallardo, 2007):

- Análisis químicos.
- Análisis biológicos.
- Análisis organolépticos.

2.5.1 Parámetros relacionados al procesamiento y conservación del forraje

- **Materia Seca (% MS):** indica indirectamente la cantidad de agua del forraje. Los balances de dieta deben realizarse siempre sobre base seca. El agua diluye los nutrientes (Gallardo, 2007).

- **Potencial Hidrógeno (pH):** Concentración de iones hidrógeno (H⁺), indica el grado de acidez del material. Valores de pH superiores a 5,5 indican una inadecuada fermentación láctica, con posible fermentación butírica (Gallardo, 2007).

- **Nitrógeno Amoniacal (NH₃)** como proporción del nitrógeno total del forraje (NH₃ / %NT): indica el grado de desaminación o degradación de las proteínas. No son adecuados los valores superiores al 15% (Gallardo, 2007).

- **Nitrógeno insoluble en detergente neutro y en detergente ácido (NIDN y NIDA/%NT, respectivamente):** representan indirectamente la

proporción de proteínas ligada a la fibra y por lo tanto poco degradables y/o no disponibles para el animal respectivamente. No son adecuados los valores superiores al 15% de NIDA e indican que en el forraje se ha producido la reacción de Maillard (calentamiento con formación de compuestos indigestibles). Confiere al material un típico color marrón y cierto olor a “tabaco” (Gallardo, 2007).

- **Ácido láctico (% ó mmoles):** es el principal producto de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos del forraje. Es un ácido graso volátil, fuente de energía. Una buena fermentación produce no menos de 3 % de ácido láctico. Aumenta cuando hay ALM o azúcares solubles en el forraje (Gallardo, 2007).

- **Ácido butírico (% ó mmoles):** es también un ácido graso volátil, pero producto de una fermentación indeseable de los carbohidratos, en presencia de oxígeno. No son adecuados aquellos valores superiores a 0,1%. Confiere al material un olor pútrido. El animal rechaza este tipo de alimento (Gallardo, 2007).

- **Micotoxinas:** metabolitos secundarios producidos por ciertas especies de mohos que crecen sobre diversos alimentos, bajo determinadas condiciones ambientales. Son compuestos que causan enfermedades, tanto en el hombre como en los animales, conocidas con el nombre genérico de micotoxicosis. Las determinaciones sugeridas y los límites máximos de aceptación son: aflatoxinas (25 ppb); deoxinivalenol o DON (300 ppb); zearalenona (250 ppb) y el tricoteceno toxina T-2 (100 ppb) (Gallardo, 2007).

2.5.2 Parámetros relacionados con la composición química

- **Proteína bruta (% PB):** esta fracción incluye también las sustancias nitrogenadas no proteicas (NNP) como aminos, amidas, urea, nitratos, péptidos y aminoácidos aislados. No siempre un alto nivel de PB significa buen nivel proteico. Los compuestos NNP, solubles o muy degradables, poseen menor valor nutricional que las proteínas verdaderas (Gallardo, 2007).

- **Fibra detergente neutro (% FDN):** representa los componentes de la pared celular de las plantas: hemicelulosa, celulosa, lignina, etc. No siempre un alto valor de FDN implica un alimento de tipo “fibroso”, todo

depende de su composición química (grado de lignificación) y del tamaño de las partículas. Si son muy pequeñas se dispondrá de menos “fibra efectiva” (FDNef) (Gallardo, 2007).

- Fibra detergente ácido (% FDA): es una parte de la pared celular compuesta por celulosa ligada a lignina, además de compuestos Maillard; sílice; cutina, etc. Esta fracción es un indicador indirecto del grado de digestibilidad del forraje: cuanto más alta, menos digestible (Gallardo, 2007).

- Lignina (% Lg): lignina es un polifenol que se produce cuando maduran las plantas, para darle rigidez y sostén, por eso principalmente se encuentra en los tallos y en general es mayor en ciertas leguminosas (alfalfa, lotus, trébol rojo). La lignina actúa como una barrera para la digestión microbiana ruminal de la celulosa y la hemicelulosa, que en estado casi puro son muy digestibles (Gallardo, 2007).

- Cenizas (%Cz): esta fracción está compuesta de minerales (macro y micro-elementos), tanto propios del vegetal como adquiridos del ambiente. En casi todos los forrajes esta fracción es inferior al 10%. Si supera este valor, hay fuertes sospechas de contaminación con tierra. En muchos casos es recomendable analizar en las cenizas los contenidos de minerales clave para el balance de la dieta (calcio, potasio; fósforo, magnesio, etc.) (Gallardo, 2007).

- Extracto etéreo (%EE): es la fracción de lípidos del alimento. Contiene principalmente aceites y grasas. Valores superiores al 14 % indican que el alimento en cuestión no debería integrar una gran proporción de la dieta total. Pueden ser tóxicos para las bacterias ruminales. Además, durante el almacenamiento predisponen a enranciar los materiales cuando éstos no están adecuadamente acondicionados (Gallardo, 2007).

2.5.3 Parámetros relacionados con la digestibilidad (análisis biológicos)

- Digestibilidad in vitro de la materia seca (%DIVMS): indica indirectamente cuánto alimento quedará retenido en el tracto gastrointestinal para ser digerido (en rumen e intestinos). Si los valores son inferiores al 55%, el forraje se considera de muy baja calidad. Este análisis

todavía se utiliza para calcular el valor energético de los forrajes sin embargo, está comprobado que en muchos casos no es un buen estimador (Gallardo, 2007).

- Proteínas degradables y no degradables en rumen (%PDR-%PNDR): se determinan mediante la técnica de “bolsitas de nylon” incubadas durante determinados períodos de tiempo en el rumen de un animal canulado ad hoc. Si las proteínas son muy degradables (más del 70%) en el rumen se producirá una gran cantidad de NH₃. En cambio, cuando los alimentos altos en PB poseen más del 50% de PNDR se consideran del tipo “pasantes” (Gallardo, 2007).

- Fibra detergente neutro-digestible (FDN digestible): es el más nuevo de los análisis. Se determina mediante una técnica in vitro similar a la DIVMS. Indica de manera indirecta qué proporción de la pared celular del forraje podrá ser digerida en rumen (Gallardo, 2007).

- Tamaño de partícula: este análisis, también de reciente ajuste, se realiza pasando una muestra del forraje a través de un sistema de tamices con tamaños de poros estandarizados. Se utiliza normalmente el denominado separador de partículas “Penn State” (set de 3 a 4 bandejas, tipo zarandas). Este análisis es un buen indicador de la efectividad de la fibra del forraje (FDNef) (Gallardo, 2007).

- Análisis organolépticos:

- Color: gama de colores del verde al marrón oscuro. Indicador de las condiciones de almacenamiento, del grado de humedad del material, la ocurrencia de reacción de Maillard y también de la presencia de hongos. En caso de silaje de maíz, el verde de tono ligeramente “oliva” indica condiciones adecuadas de procesamiento y almacenamiento. Marrón oscuro, reacción de Maillard (que genera una especie de lignina artificial) y si se visualizan secciones blancas, presencia de hongos (Gallardo, 2007).

- Olor: del suave perfume a vinagre al rancio-putrefacto. Indica si las condiciones de procesamiento fueron adecuadas (suave a vinagre); fermentación hiper-acética-material húmedo (avinagrado); fermentación butírica (putrefacto y rancio); fermentación alcohólica (olor a alcohol, por ejemplo, en grano húmedos almacenados muy “secos” y presencia de

oxígeno). En el caso del heno, olor a tabaco fuerte indica reacción de Maillard (Gallardo, 2007).

- Textura: flexibilidad y humedad de tallos y hojas, aspectos del grano. Tallos muy “leñosos” y trozos visibles de mazorcas; material seco, desperejo, áspero pero “mullido”; forraje que “moja” o está “resbaloso”. Granos pastosos y suaves al tacto o granos duros y vítreos; granos inmaduros con aspecto “lechoso”. Estas determinaciones son indicadores del estado en que el cultivo se ha procesado y preservado (Gallardo, 2007).

2.6 Constitución y composición de los granos de sorgo y maíz

Los granos de cereales tales como el sorgo y el maíz, son considerados granos desnudos puesto que pierden las envolturas durante la cosecha. Estos granos, están constituidos por tres componentes: una capa protectora que los recubre o pericarpio, el embrión o germen y el tejido de almacenamiento o endosperma. De los tres componentes la mayor proporción del peso del grano la constituye el endosperma, el cual puede variar entre un 80-85%, mientras que el germen oscila entre 7-12% y el pericarpio no supera el 8% (Montiel y Elizalde, 2004).

El endosperma está conformado por áreas bien diferenciadas: una córnea o vítrea y otra harinosa, las que a su vez están rodeadas por una zona periférica o sub-aleurona denominada endosperma periférico. La proporción en la que se encuentran cada una de dichas áreas varía según el híbrido que se considere. El endosperma, tanto vítreo como harinoso, está compuesto por gránulos de ALM, la matriz proteica y los cuerpos proteicos y, la proporción de cada uno de ellos como así también su tamaño depende del lugar en donde se ubiquen (porción vítrea como harinosa) (Montiel y Elizalde, 2004).

La naturaleza y la composición química de la matriz proteica tiene un profundo efecto sobre las características físicas del endosperma y la exposición de los gránulos de ALM a la digestión enzimática (Montiel y Elizalde, 2004).

Los granos de sorgo generalmente tienen una mayor proporción de endosperma periférico que el maíz. Dicho endosperma es difícil de definir,

pero usualmente consiste de las primeras dos a seis capas de células que se encuentran por debajo de la capa de aleurona. La zona del endosperma periférico es extremadamente dura, densa y resistente a la entrada del agua. Dicha área está compuesta de varias capas de células que contienen mayor cantidad de cuerpos proteicos (prolaminas) y gránulos de ALM más pequeños que los del endosperma córneo propiamente dicho. Como consecuencia de la alta concentración de cuerpos proteicos en el área periférica, el ALM prácticamente no está disponible para la degradación enzimática (Montiel y Elizalde, 2004).

Las diferencias en la estructura del endosperma periférico del grano puede afectar la digestibilidad en mayor proporción que cualquier otro factor. La alteración de esta zona es la que generaría la respuesta al procesamiento y el consecuente aumento en la digestión de los nutrientes (Montiel y Elizalde, 2004).

Si bien el grano de maíz también presenta endosperma periférico, el hecho de estar más desarrollado en el sorgo determinaría la menor digestión promedio de éste respecto del grano de maíz (Montiel y Elizalde, 2004).

Los gránulos de ALM en los endospermos periférico y córneo están rodeados por cuerpos proteicos y se encuentran embebidos en una densa y continua matriz proteica. El endosperma harinoso localizado en el centro del grano, posee gránulos de ALM más grandes y en mayor cuantía que los otros endospermos, y la matriz proteica que los rodea es discontinua y con menor cantidad de cuerpos proteicos. Además, dicho endosperma, presenta espacios de aire por el menor empaquetado de los gránulos de ALM, los cuales son más susceptibles a acciones externas como el procesamiento de los granos o la digestión (Montiel y Elizalde, 2004).

El principal componente químico de los granos es el ALM, el que puede variar entre un 70-80% de la MS del grano (Montiel y Elizalde, 2004).

Además, los granos presentan pequeñas cantidades de pectinas y azúcares simples, los cuales junto con el ALM componen los carbohidratos no estructurales del grano. Los gránulos de ALM están compuestos por dos moléculas principales, amilosa y amilopectina. La proporción de ambas en los gránulos determina la tasa y la extensión de la digestión. La amilosa es

un polímero lineal compuesto de unidades de D-glucosa unidas por enlaces tipo -1,4. A pesar de esto se ha descubierto que la amilosa puede presentar un pequeño número de ramificaciones las cuales no superan el 1-2% de la molécula. La proporción de amilosa en el ALM puede variar entre un 0-30% (Montiel *et al.*, 2004).

Generalmente, los cereales poseen entre un 20-30% de amilosa, pero existen los denominados granos tipo waxy o cerosos donde la cantidad de amilosa es muy pequeña o prácticamente no está presente (Montiel *et al.*, 2004).

La amilopectina es un polímero ramificado y comprende entre el 70-80% del ALM de los granos. Está formada por una cadena lineal de unidades -1,4-D-glucosa y ramificaciones -1,6 cada 20 ó 30 moléculas de glucosa, las que constituyen entre 4-5% del número total de uniones de la amilopectina. La cantidad de ramificaciones puede variar entre genotipos de una misma especie y cada una de las ellas tiene una longitud de aproximadamente 20 unidades de glucosa (Montiel y Elizalde, 2004).

Los gránulos de ALM presentan áreas organizadas o cristalinas, y áreas no organizadas o amorfas. La región cristalina está principalmente compuesta por amilopectina, y la zona amorfa es más rica en amilosa, menos densa que la cristalina. Las moléculas de amilosa y amilopectina permanecen juntas por uniones puente hidrógeno (Montiel y Elizalde, 2004).

La proporción de amilosa y amilopectina varía entre granos y está determinada genéticamente. Las diferencias entre los contenidos de amilosa y amilopectina pueden afectar tanto la digestibilidad del ALM, como así también las propiedades de procesamiento de los granos. La amilosa se disuelve con cierta dificultad en agua y precipita en butanol, mientras que la amilopectina es la fracción del ALM más soluble en agua o en solución acuosa de butanol. Por esta razón, la variación en la proporción de amilosa y amilopectina que se puede presentar entre híbridos podría estar relacionada con diferencias en la fracción soluble de los granos afectando la respuesta al procesamiento (Montiel y Elizalde, 2004).

La digestibilidad del ALM es inversamente proporcional al contenido de amilosa, por lo cual los sorgos y maíces con mayor contenido de amilosa serían menos digestibles (Montiel y Elizalde, 2004).

Una de la teorías por la cual la amilosa disminuiría la hidrólisis se debería a que la primera orientaría hacia el interior de la misma las moléculas de amilopectina, de manera tal que incrementaría las uniones puente hidrógeno de las moléculas y por lo tanto limitaría tanto el hinchamiento de los gránulos de ALM como así también la hidrólisis enzimática (Montiel y Elizalde, 2004).

El segundo componente que se encuentra en mayor proporción en el grano son las proteínas, y la concentración de las mismas aumenta desde el centro del endosperma hacia el exterior, por lo que se podría afirmar que el área que rodea a la periferia del endosperma contiene la mayor concentración de proteínas (Montiel y Elizalde, 2004).

El endosperma córneo posee dos veces más proteína que el harinoso. En el sorgo existen varios tipos de proteínas que exhiben diferencias respecto a sus propiedades físicas, actividad biológica, y calidad nutricional (Montiel y Elizalde, 2004).

Según lo propuesto por Osborne (citado por Montiel y Elizalde, 2004) las proteínas se pueden clasificar, de acuerdo a su solubilidad en distintos solventes, en:

- 1) albúminas, solubles en agua;
- 2) globulinas, solubles en soluciones salinas;
- 3) prolaminas, solubles en alcohol,
- 4) glutelinas, solubles en diluyentes alcalinos.

Las proteínas predominantes en el grano de sorgo son las prolaminas, también denominadas kafirinas, y se encuentran principalmente en el endosperma. Las kafirinas son deficientes en aminoácidos esenciales como lisina, metionina y triptófano, lo que determina la baja calidad nutricional de la proteína del grano de sorgo. Existe una estrecha asociación entre la cantidad total de proteína del grano y el de kafirinas. Por esto, a pesar de que el nivel de proteína aumenta la calidad nutricional del grano disminuye. De igual forma, Taylor, Schüssler y van der Walt (citado por

Montiel y Elizalde, 2004) encontraron que al aumentar la cantidad total de proteínas en el grano, la principal fracción que se incrementó fueron las kafirinas. Eso no coincide con lo presentado por Chandrashekar y Kirleis (citado por Montiel *et al.*, 2004), quienes no hallaron una relación consistente entre el contenido de proteínas totales y la presencia de kafirinas ($r=-0,07$) (Montiel y Elizalde, 2004).

Para el caso del maíz, según lo expuesto por Owens (citado por Hoffman *et al.*, 2011), la matriz proteica que envuelve al granulo de ALM se ha definido como un impedimento físico-químico en la digestión del ALM en rumiantes. Esta matriz proteica está conformada principalmente por proteínas que reciben el nombre de zeinas y comprenden del 50-60 % de la proteína total en maíz entero (Hoffman *et al.*, 2011).

Las glutelinas son las segundas proteínas en orden de importancia respecto a la cantidad presente en el grano, y junto con las prolaminas forman parte de las proteínas de reserva del mismo. La matriz proteica está formada principalmente por glutelinas, mientras que los cuerpos proteicos están constituidos por kafirinas (Montiel y Elizalde, 2004).

Por último, las albúminas y globulinas se encuentran en pequeñas cantidades. En el grano de sorgo estas últimas forman parte de las enzimas y otras sustancias biológicamente activas, y principalmente se encuentran ubicadas en la capa de aleurona (Montiel y Elizalde, 2004).

La disponibilidad del ALM a nivel ruminal se encuentra fuertemente influenciada por la solubilidad y fermentación de las proteínas. El tipo y cantidad de proteínas de almacenamiento en el grano determina su solubilidad. Las prolaminas al ser insolubles en el licor ruminal afectarían en forma negativa la disponibilidad de ALM para la degradación bacteriana (Montiel y Elizalde, 2004).

El endosperma periférico que presentan los granos de sorgo y maíz, con gran contenido de cuerpos proteicos y por consiguiente de prolaminas, es la principal barrera que deben atravesar las bacterias ruminales sobre todo cuando el grano no se halla procesado (Montiel y Elizalde, 2004).

2.7 Interacción almidón – proteína en granos de sorgo y maíz

El principal componente energético de los granos de sorgo y maíz es el ALM que se encuentra en el endosperma de las semillas (Montiel y Elizalde, 2004).

Existen factores físicos y químicos que afectan la disponibilidad del ALM para que sea hidrolizado por las enzimas. La accesibilidad a los gránulos de ALM depende de la composición química y el grosor de la pared de las células que los recubren, y de su asociación intracelular con proteínas que pueden impedir o disminuir el ataque enzimático (Montiel *et al.*, 2004).

La matriz proteica y los cuerpos proteicos que rodean los gránulos de ALM limitan severamente el acceso bacteriano a este último, lo que afecta su digestibilidad y aprovechamiento por parte del animal. Ello se debe a la insolubilidad de la mayoría de las proteínas del endosperma y a la manera en que ellas enlazan los gránulos de ALM, aumentando la dificultad para digerir los granos de sorgo (Montiel y Elizalde, 2004).

McAllister, Phillippe, Rode y Cheng (citado por Montiel y Elizalde, 2004) indicaron que, luego de que la cutícula es rota, la matriz proteica y la pared de las células del endosperma determinan la tasa a la cual los microorganismos atacan y penetran los gránulos de ALM.

La dureza o vitrosidad en los granos de sorgo y de maíz está relacionada con la proporción de ambos endospermas (vítreo y harinoso) (Montiel y Elizalde, 2004).

Esto repercute a su vez sobre el contenido total de proteínas del grano y en la continuidad de la matriz proteica, ya que la misma se puede presentar en forma continua (endosperma córneo) o discontinua (endosperma harinoso) (Montiel y Elizalde, 2004).

Existe una relación positiva entre la vitreosidad y el nivel de prolaminas. Aunque esta relación no es absoluta, se puede decir que hay diferencias en la composición química entre granos vítreos y aquellos más harinosos y opacos (Hoffman *et al.*, 2015).

Estas diferencias en el nivel de encapsulación de los gránulos de ALM pueden apreciarse usando microscopía de barrido electrónico como lo muestran las figura 1 y 2 (Hoffman *et al.*, 2015).

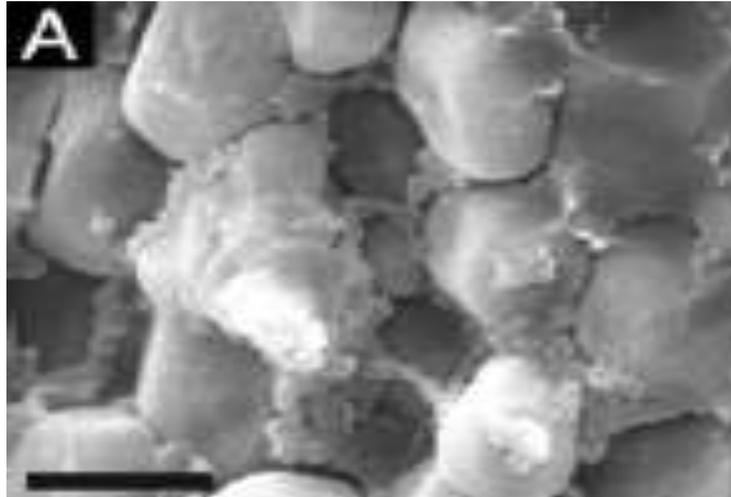


Figura 1. Microscopía de barrido electrónico de gránulos de ALM de maíz fuertemente incrustados en la matriz de proteínas de prolaminas (Gibbon, 2003, citado por Hoffman *et al.*, 2015).

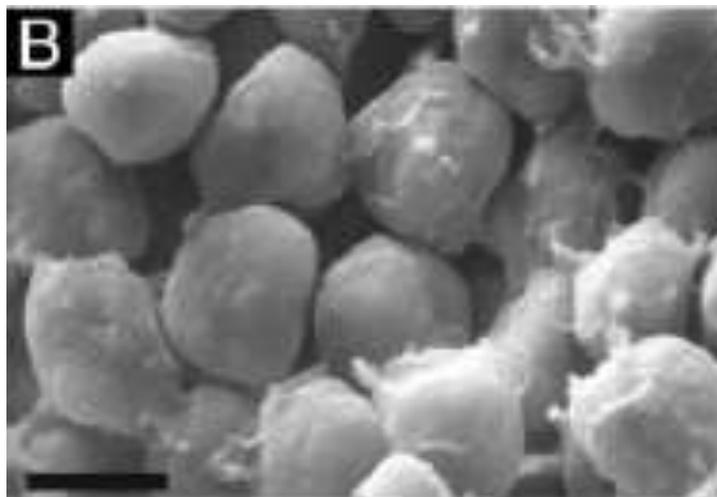


Figura 2. Microscopía de barrido electrónico de gránulos de ALM en maíz opaco con un nivel de encapsulación menor en la matriz proteica (Gibbon, 2003, citado por Hoffman *et al.*, 2015).

Además, Chandrashekar y Mazhar (citado por Montiel y Elizalde, 2004) demostraron que un grano más duro deposita una mayor cantidad de cuerpos proteicos y de prolaminas que uno más blando. Por su parte, Abdelrahman y Hosney (citado por Montiel y Elizalde, 2004) concluyeron que las prolaminas son las responsables de conferirle dureza al grano.

Existen diferencias entre los granos respecto al tamaño y las características de los gránulos de ALM que podrían afectar su digestión. Sin embargo, parecería que los roles que desempeñan la matriz proteica y los carbohidratos no almidonosos en unir dichos gránulos de ALM, es más importante que la estructura del gránulo per se en determinar su tasa y extensión de la digestión (Montiel y Elizalde, 2004).

Cuando se estudió la digestibilidad de almidones purificados de cultivares de sorgo y maíz hallaron que el ALM del sorgo resultó ser más digestible que el del maíz. Sin embargo, esto no sucede cuando se incuban granos donde el ALM tiene interacción con la matriz proteica, destacando entonces la importancia de la matriz proteica del endosperma en determinar la digestión del ALM por el animal (Montiel y Elizalde, 2004).

En estudios donde se efectuaron tratamientos con proteasas, se observó que la matriz proteica se digería antes que los cuerpos proteicos. Con ello quedó demostrada una mayor resistencia de los cuerpos proteicos ante la presencia de las enzimas, lo cual resulta lógico debido a que ellos son los principales puntos de deposición de prolaminas (Montiel y Elizalde, 2004).

De acuerdo a lo anterior, las proteínas en los granos (principalmente las prolaminas), pueden ser muy importantes en determinar la cantidad de ALM digerido a nivel ruminal además de otros factores tales como la presencia de taninos (Montiel y Elizalde, 2004).

A pesar de todos estos trabajos, existen autores que no han encontrado interacción entre el contenido de proteínas totales y la desaparición *in vitro* del ALM (Montiel y Elizalde, 2004).

2.7.1 Digestibilidad del almidón

Estudios de investigación han demostrado una relación negativa entre el nivel de vitreosidad (nivel de prolaminas) de un cereal forrajero y la degradabilidad o digestibilidad del ALM. En la universidad de Wisconsin demostraron que la digestibilidad del ALM disminuyó 0,86 unidades porcentuales por cada unidad porcentual de aumento en el contenido de prolamina (Hoffman *et al.*, 2011).

2.7.2 Efecto del procesado del grano

El principal efecto del procesado de los granos es alterar el sitio de digestión del ALM pasándolo desde el intestino hacia el rumen, con un consecuente incremento adicional en el porcentaje digerido en ambos sitios (Hoffman *et al.*, 2011).

Los granos responden de diferente manera ante el procesamiento, y la magnitud de la respuesta al procesamiento sobre la utilización del ALM, es mayor en el sorgo y el maíz que en la cebada. Esto remarca las diferencias que existen entre los tipos de granos en relación a la digestibilidad del ALM y la proteína y a la interacción entre dichos componentes (Hoffman *et al.*, 2011).

La ruptura de la barrera física que recubre los granos a través del procesamiento, reduce el tamaño de partículas, incrementando la superficie de contacto disponible para la unión de los microorganismos y el ataque enzimático (Hoffman *et al.*, 2011).

2.7.3 Efecto del tiempo de ensilado sobre la disponibilidad de almidón

Numerosos trabajos se refieren a la degradación de la matriz proteica formada por prolaminas hidrofóbicas, que envuelven y unen los gránulos de ALM durante el proceso de ensilaje, aunque es limitada aun la información detallada respecto al tema (Hoffman *et al.*, 2011).

Según Hoffman (2011), la matriz proteica podría ser degradada potencialmente por solubilización proteica durante el proceso de ensilaje o bien por una actividad proteolítica que se mantendría activa durante la fase estable del silaje. A pesar de que esta matriz es hidrófoba lo que la hace insoluble en agua o fluido ruminal, es soluble en ácido acético y láctico, pudiendo tener inferencia también la intensidad de la fermentación durante el proceso de ensilado. En su trabajo pudo corroborar su hipótesis, apoyando la de otros autores, poniendo en evidencia a través de imágenes de barrido electrónico, el efecto del proceso de ensilaje en dos híbridos distintos (HMC A Y HMC B) luego de 240 días de confeccionado, como lo muestra la figura 3.

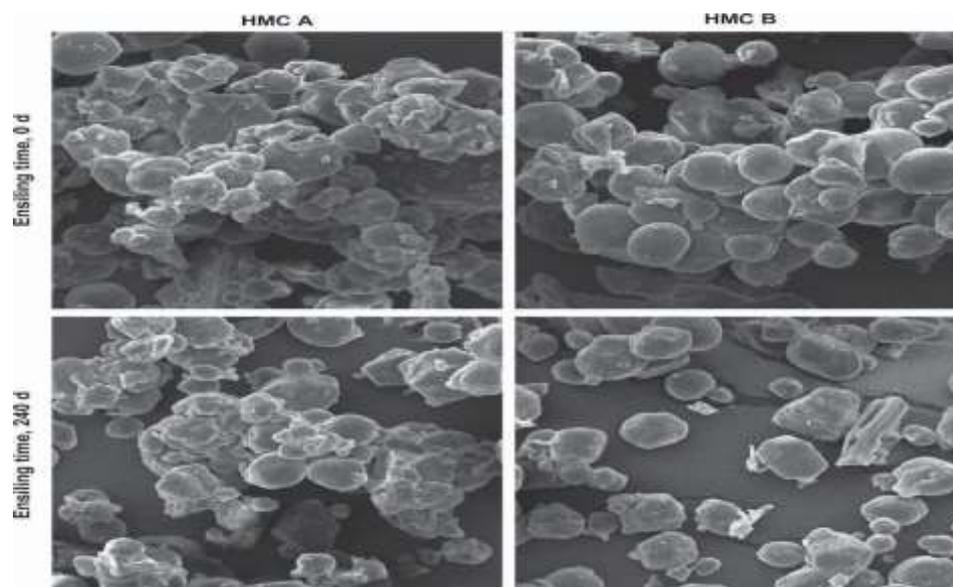


Figura 3. Imagen microscópica de barrido electrónico. Efecto del proceso de ensilaje en dos híbridos distintos (A Y B) sobre la matriz proteica de ensilado de maíz luego de 240 días de confeccionado (Hoffman *et al*, 2011).

Como puede apreciarse en la imagen de A y B al día 0 de ensilado hay diferencias en la conformación de la matriz proteica pudiendo deberse a diversos factores como por ejemplo, el híbrido utilizado y el nivel de madurez del material a ensilar. Luego de 240 días de ensilado, se observa muy claramente la ruptura y disociación de la matriz proteica, presentando también diferencias entre los materiales, las cuales pueden deberse principalmente al nivel de encapsulación del ALM por parte de la matriz proteica, la intensidad de la fermentación y la longitud del periodo de ensilaje (Hoffman *et al.*, 2011).

Der Bedrosian *et al.* (2012), exponen que varios procesos metabólicos importantes siguen activos luego de la fase estable de un silaje pudiendo afectar los productos finales de la fermentación y el valor nutritivo de un silaje.

De acuerdo a los valores obtenidos, se comprobaron niveles crecientes de amoníaco y éstos se correlacionan positivamente con los datos para ALM, que también aumentaron a medida que avanza el tiempo de ensilado, lo que sugiere que hay actividad proteolítica activa durante la

fase estable del silaje y que sería la responsable de la mejora de los mayores niveles relativos de ALM obtenidos (Der Bedrosian *et al.*, 2012).

Aunque un almacenamiento prolongado parece ser beneficioso para silajes de maíz y sorgo, tanto de grano como planta entera es necesario realizar un seguimiento de los mismos en el tiempo y poder hacer mayor cantidad de estudios (Der Bedrosian *et al.*, 2012).

De acuerdo a lo expuesto por Hoffman y Shaver (2009), la fermentación degrada las prolaminas en función a su intensidad y el tiempo de ensilado, pero es difícil de medir en laboratorio el nivel de degradación, aunque la concentración de proteínas y de amoníaco son excelentes marcadores para predecirla.

Son muchas las investigaciones que muestran que el aumento del tiempo de almacenamiento produce una mejora potencial en la disponibilidad del ALM en silajes, lo cual ha generado que muchos productores alteren sus inventarios de silajes para garantizar que permanezcan almacenados un mínimo de 4 a 6 meses. Esto puede causar nuevos desafíos, ya que, se requiere de espacio adicional y por sobre todo de un excelente manejo de la integridad de los silajes, especialmente en evitar el acceso del oxígeno a la masa del ensilaje (Young *et al.*, 2012).

2.7.4 Efecto de la adición de proteasas al silaje

Young *et al.*, (2012), en su trabajo de investigación sobre el efecto de la adición de enzimas proteasas en un ensilaje de maíz sobre el valor nutritivo del mismo, encontraron que, en los materiales ensilados sin tratar, luego de un tiempo prolongado de almacenamiento (150 días) se sucedían cambios en la concentración de amoníaco y proteína soluble acompañados también de un incremento relativo en el ALM, dejando en evidencia lo propuesto por Hoffman (2011), en cuanto a una actividad proteolítica activa luego de la estabilización del ensilado.

Para aquellos materiales tratados con enzimas proteasas se obtuvieron incrementos en los valores de proteínas solubles, amoníaco y por ende en ALM antes de los 150 días de almacenaje y superaron los valores obtenidos en los materiales sin tratar luego de los 150 días (Young *et al.*, 2012).

El tratamiento con enzimas proteasas en función a los datos obtenidos sugiere que la adición de las mismas puede ser un método viable para mejorar la disponibilidad de ALM en silajes de maíz y otros cultivos de alto contenido de ALM, sin tener que esperar a que este proceso de proteólisis se dé naturalmente luego de cierto tiempo de almacenaje (Young *et al.*, 2012).

Este enfoque puede ser cuestionado por algunos ya que la proteólisis es a menudo excesiva en silajes y se han hecho varios intentos para disminuirla en lugar de aumentarla, especialmente en leguminosas, pero puede ser aceptable una mejora en la disponibilidad del ALM en silajes de maíz y sorgo a expensas de un aumento de la proteólisis (Young *et al.*, 2012).

Se necesita más investigación para garantizar que el tratamiento con enzimas proteasas no generará una proteólisis excesiva en períodos prolongados de tiempo, aunque podrían ser usadas en ensilajes que se darán de manera rápida no superando los 6 meses (Young *et al.*, 2012).

En la investigación realizada por Windle *et al.*, (2014), donde evaluaron el efecto de la adición de una enzima proteasa a silaje de maíz confeccionado en distinto estado de madurez, vieron que los resultados obtenidos apoyaban los datos generados por Young *et al.*, (2012), y además sugieren que el maíz podría ser cosechado en estado avanzado de madurez para obtener altos rendimientos de MS y ALM, siempre y cuando se lo trate con proteasas a la hora de confeccionar el ensilaje, obteniendo aún buenos niveles de digestibilidad del ALM.

No obstante, el productor seguirá teniendo los problemas de manejo de un material en estado avanzado de madurez, como por ejemplo, dificultad a la hora de compactar y eliminar el oxígeno de la masa del ensilado (Windle *et al.*, 2014).

Kung *et al.*, (2014), también realizaron una investigación con adición de proteasas, pero en esta oportunidad lo hicieron sobre ensilaje de grano húmedo de maíz. El resultado del ensayo fue un aumento de la proteína soluble y el amoníaco acompañado de un incremento en la digestibilidad del

ALM. Estos hallazgos apoyan los obtenidos por Young *et al.*, (2012) y Windle *et al.*, (2014).

Así, el uso de una enzima proteasa en un ensilado permite obtener altas digestibilidades de ALM en períodos cortos de tiempo (Kung *et al.*, 2014).

3 HIPÓTESIS

La calidad de los silajes de planta entera de sorgo y maíz variará según el tiempo de ensilado, aumentando la digestibilidad de la FDN y disponibilidad del almidón.

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del tiempo transcurrido desde la confección de ensilaje de sorgo y maíz sobre el valor nutricional del forraje conservado.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar los cambios a lo largo del tiempo en la composición química y calidad fermentativa de silajes de planta entera de maíz y sorgo.
- Evaluar los cambios a lo largo del tiempo en la fermentabilidad, a través de los parámetros que describen la cinética de producción de gas de silajes de planta entera de maíz y sorgo.
- Evaluar los cambios a lo largo del tiempo en la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) en silajes de planta entera de maíz y sorgo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación del experimento

El ensayo se realizó en las instalaciones de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Manfredi, Provincia de Córdoba, Argentina. Se encuentra ubicada en latitud 31°49'12" S y longitud. 63°46'00" W, con una elevación de 292 metros sobre el nivel del mar (INTA, 1987).

5.2 Materiales

Los materiales utilizados son:

- Muestras tomadas de material picado de plantas enteras de maíz var. AX 886 MG Nidera y sorgo var. Antel INTA Peman.
- Tubos de PVC con tapa en sus dos extremos para la confección de los microsilos.
- Prensa hidráulica manual para realizar el prensado del material picado.
- Cinta adhesiva para el sellado de las tapas de los microsilos.
- Balanza tipo reloj colgante con trípode para el pesado de los microsilos.
- Frascos de vidrio para la maceración de las muestras de microsilos.
- Bandejas de aluminio para realizar MS a 105 °C.
- Balanza de laboratorio.
- Medidor digital portátil de pH Sartorius PT-10 (Sartorius AG, Göttingen, Germany) con electrodo de membrana de vidrio combinado PY-P12.
- Ultra-freezer (REVCO ULT1386-5-V41, Thermo Electron Corp., Asheville, NC, USA).
- Liofilizador (Labconco FreeZone 12, Labconco Corp., Kansas City, MO, USA).
- Molinillo (Wiley Mill 4, Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA).

- Equipo ANKOM 220 Fiber Analyzer (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA).
- Unidad de digestión FOSS Tecator (FOSS Analytical, Höganäs, Sweden).
- Equipo de destilación y titulación automática (FOSS Kjeltac 8400 – con automuestreador 8420, FOSS Analytical, Höganäs, Sweden).
- Kit K-TSTA (Megazyme, Ireland).
- Espectrofotómetro.
- Equipo Daisy II Ankom.
- Frascos de vidrio color ámbar de 250 ml.
- Septos de goma, precintos de aluminio y pinza coloca precinto.
- Licor ruminal.
- Termos para conservar licor ruminal.
- Licuadora y lienzo para acondicionar licor ruminal.
- Jeringa automática para dosificar licor ruminal.
- Medidor de presión marca Sper Scientific 840065 y traductor de presión modelo PS100-2BAR.
- Jeringa y agujas para liberar presión de los frascos.
- Freezer (-18 °C).
- Material para la toma de datos (planilla, lápiz, etc.).
- Material de laboratorio.
- Temporizador de laboratorio.

5.3 Metodología

Se confeccionaron 36 microsilos (3 bloques) con material picado de planta entera tanto de maíz (18 microsilos) como de sorgo (18 microsilos). Los bloques se confeccionaron de acuerdo al momento de confección del microsilo, ya que el material picado se recibió todo junto mientras que la confección de los microsilos requiere de cierto tiempo para su compactación y sellado. Esto se realizó de esta forma ya que ciertas variables de estudio pueden ser afectadas por el tiempo transcurrido entre el picado y la compactación.

Se determinó la densidad de cada microsilo al momento de la apertura (relación peso sobre volumen).

Se evaluó el material picado original y se muestreó 1 microsilo por cada bloque y material a los 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de confeccionado.

En fresco se determinó N-NH₃, a través del método reacción de color por fenol-hipoclorito (Nocek *et al.*, 1987), pH y porcentaje de MS a 105 °C.

El pH se determinó por el método potenciométrico con un medidor digital portátil de pH Sartorius PT-10 (Sartorius AG, Göttingen, Germany) con electrodo de membrana de vidrio combinado PY-P12.

Por otro lado, se obtuvieron muestras que fueron conservadas a -70 °C en ultra-freezer hasta ser liofilizadas. Luego se liofilizaron hasta peso constante. En el paso siguiente fueron molidas con un molinillo con tamiz de 2 mm y se conservaron a -18°C.

Sobre las muestras molidas se determinó: % materia seca (%MS), % materia orgánica (%MO), % proteína bruta (%PB), % fibra detergente ácido (%FDA), % fibra detergente neutro (%FDN), % lignina detergente ácido (%LDA) (Jaurena y Wawrzkievicz, 2013), % nitrógeno insoluble en detergente ácido (%NIDA) y % almidón (%ALM).

Se determinó el contenido de %FDN con agregado de α -amilasa termoestable y FDA, usando un equipo ANKOM 220 Fiber Analyzer siguiendo el método secuencial, según proponen Jaurena y Wawrzkievicz (2013).

El contenido de PB y NIDA fue estimado por el método Kjeldahl utilizando una unidad de digestión FOSS Tecator y un equipo de destilación y titulación automática (FOSS Kjeltex 8400).

El contenido total de ALM se determinó midiendo el contenido de glucosa a través de una reacción colorimétrica por espectrofotometría a 510nm de longitud de onda, en muestras previamente gelatinizadas e hidrolizadas con enzimas específicas utilizando el kit K-TSTA (Megazyme, Ireland) (McCleary *et al.*, 1997). La determinación de ALM total incluye al ALM "resistente" previamente disuelto con hidróxido de potasio (2 M) en frío ($\approx 4^\circ\text{C}$).

Se determinó la DIVMO, hasta las 48 horas de incubación con licor ruminal más buffer en equipo Daisy II Ankom según técnica de Tilley y Terry (1963) modificada por Holden (1999).

Se midió la producción de gas (indicador de fermentabilidad). En frascos de vidrio color ámbar de 250 ml se colocaron, por triplicado, 1 g de MS de cada muestra liofilizada y molida. Además se utilizaron tres blancos con fluido ruminal y buffer (bicarbonato/ fosfato) usados para corrección y tres frascos con alfalfa (*Medicago sativa*) usados como testigo. Previo a la inoculación con licor ruminal filtrado (20 ml), los frascos fueron llevados a 39 °C ya que previamente el sustrato había sido embebido durante 12 horas a 4 °C en 80 ml buffer (bicarbonato/ fosfato). A cada frasco se le insufló CO₂, luego se los selló con septo de goma y precinto de aluminio, y se los incubó por 72 h a 39 °C.

A tiempos regulares se midió la presión de gas con un medidor de presión marca Sper Scientific 840065 y traductor de presión modelo PS100-2BAR. La producción de gas (PG) se calculó por regresión lineal entre presión interna y volumen; la relación entre estas variables fue obtenida en ensayos anteriores realizados bajo las mismas condiciones de cultivo. Luego de cada lectura se liberó el gas acumulado en el interior, hasta equilibrar con la presión atmosférica (lectura 0 psi); y a continuación los frascos fueron agitados manualmente. Para finalizar el proceso de incubación y detener la actividad microbiana, los frascos se colocaron en agua a 4 °C y se conservaron en freezer (-18 °C).

El licor ruminal se obtuvo de novillos donantes alimentados con una dieta estándar para uso de laboratorio compuesta de heno de alfalfa de buena calidad y 4 kg de maíz por día.

La capacidad fermentativa se evaluó a través del patrón de fermentación *in vitro* del ensilaje incubado. Este patrón se caracteriza a través del análisis de los distintos parámetros que describen la cinética de producción de gas, los cuales fueron estimados por medio del modelo no lineal desarrollado por France *et al.* (1993): $Y = A * (1 - e^{-b * (t - \text{lag})} - c * (\sqrt{t - \text{lag}}))$

Donde:

Y = gas total acumulado (ml/g MO)

A = asíntota del modelo (ml/g MO incubada)

b = tasa de fermentación (h⁻¹)

lag = tiempo de retardo en que se inicia la fermentación (h)

c = tasa de caída (h^{-1/2})

t = tiempo de incubación (h)

5.4 Variables

Las variables de estudio fueron las siguientes: %MS, %MO, %PB, %FDN, %FDA, %LDA, %NIDA, %ALM y %DIVMO y los parámetros que describen el patrón de fermentación ruminal de los materiales.

5.5 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizaron bloques completos al azar con 7 tratamientos por cultivo (0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 meses de maduración del silaje). Un tratamiento en el cultivo maíz fue descartado por mal estado de conservación.

Los parámetros que caracterizan el patrón de fermentación ruminal y la dinámica de digestión se obtuvieron por regresiones no lineales. Dichos parámetros se analizaron mediante análisis de varianza y las medias se compararon a través del test LSD de Fisher ($\alpha=0,05$). Para ello se utilizó el programa InfoSTAT Profesional 2008 (Di Rienzo *et al.*, 2008).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El material de sorgo fresco picado utilizado para la confección de los microsilos presentó las siguientes características y composición química: %MS 105 °C 25,18, pH 5,81, N-NH₃(%/Nt) 3,33, %PB 8,70, %NIDA 8,02, %FDN 54,97, %FDA 31,14, %LDA 5,46, %ALM 16,87, %MO 90,08, %DIVMS 65,97.

En la Tabla 1 se presentan los resultados obtenidos, para las muestras de ensilaje de planta entera de sorgo. Para cada variable y cada fecha de apertura se informa el valor de la media de las tres repeticiones junto con el P-valor.

Tabla 1. Características y valor nutricional de ensilaje de sorgo conservado en microsilos a lo largo de 12 meses.

VARIABLES	MESES							P
	1	2	4	6	8	10	12	
Densidad (kgMS/m ³)	162,92	165,26	169,68	166,63	170,85	167,41	167,99	0,5322
%MS 105°C	25,07	25,43	26,11	25,64	26,29	25,76	25,85	0,1761
Ph	3,76	3,82	3,76	3,78	3,79	3,79	3,91	0,7489
N-NH ₃ (%/Nt)	7,40	7,90	7,44	10,24	9,83	9,43	11,93	0,0470
%PB	8,92	9,42	9,32	8,98	9,35	9,30	9,44	0,4937
%NIDA	7,98	6,91	6,49	7,73	7,24	6,61	7,31	0,4855
%FDN	53,08	50,95	52,56	52,64	51,93	51,41	53,06	0,9509
%FDA	31,56	30,11	30,97	31,66	31,20	31,19	32,39	0,7657
%LDA	5,73	5,47	5,23	5,40	5,38	5,54	5,71	0,2119
%ALM	S/D	18,45	S/D	20,53	19,65	18,71	18,89	0,9523
%MO	90,03	90,07	90,26	90,35	90,13	90,37	89,96	0,8473
%DIVMS	66,17	65,16	65,41	63,24	64,83	65,24	63,32	0,4652

Para las variables densidad, %MS 105 °C, pH, %PB, %NIDA, %FDN, %FDA, %LDA, %ALM, %MO y %DIVMS no se encontraron diferencias entre los distintos momentos de apertura de los microsilos.

No ocurre lo mismo en el caso de N-NH₃(%/Nt), que al igual que lo observado por Hoffman *et al.* (2009) y (2011), y luego confirmado en los estudios de Young *et al.* (2012), Kung *et al.* (2014), Der Bedrosian *et al.* (2012), y Windle *et al.* (2014), existe en los silajes un proceso de proteólisis inicial que se da en las primeras fases del proceso de conservación, incrementando los valores de N-NH₃(%/Nt) si se lo compara con el material fresco pre-ensilado, pero que luego continúa durante la fase estable del silaje y se perpetúa en el tiempo.

Esta proteólisis sería la responsable de la degradación de la matriz proteica formada por prolaminas dejando más expuestos a los gránulos de ALM para la digestión enzimática a nivel ruminal (Hoffman *et al.*, 2011).

El valor de ALM no presentó diferencias estadísticamente significativas, a pesar de ser uno de los valores que se esperaba que acompañase el incremento de N-NH₃(%/Nt), hecho que no condice con lo expuesto por otros autores, donde el valor de ALM a medida que pasa el tiempo de almacenaje se incrementa en términos relativos, acompañando el de N-NH₃(%/Nt) (Hoffman *et al.*, 2009 y 2011; Young *et al.*, 2012; Der Bedrosian *et al.*, 2012; Windle *et al.*, 2014).

Como en los trabajos de Young *et al.* (2012), los valores de FDN y FDA no presentaron diferencias significativas, no siendo afectadas por el tiempo de almacenaje.

También hay que considerar, como lo expresa Young *et al.* (2012) en su trabajo de investigación, que la cinética de variación de ciertos parámetros en la conservación, más allá que, el ensayo se realice en laboratorio y cuidando todos los aspectos posibles, pueden ser afectados los resultados por las características del lugar donde haya sido realizado el mismo, por ejemplo la temperatura ambiente.

El material de maíz fresco picado utilizado para la confección de los microsilos presentó las siguientes características y composición química: %MS 105 °C 26,77, pH 5,77, N-NH₃(%/Nt) 3,59, %PB 7,46, %NIDA 5,59,

%FDN 48,28, %FDA 24,65, %LDA 3,29, %ALM 21,63, %MO 94,46, %DIVMS 73,74.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos, para las muestras de ensilaje de planta entera de sorgo. Para cada variable y cada fecha de apertura se informa el valor de la media de las tres repeticiones junto con el P-valor.

Tabla 2. Características y valor nutricional de ensilaje de maíz conservado en microsilos a lo largo de 12 meses.

VARIABLES	MESES						P
	2	4	6	8	10	12	
Densidad (kgMS/m ³)	166,75	166,94	170,52	169,77	170,14	170,39	0,1800
%MS 105°C	26,57	26,60	27,17	27,05	27,11	27,15	0,4807
pH	3,67	3,62	3,63	3,63	3,67	3,63	0,1258
N-NH ₃ (%/Nt)	7,71	6,86	7,14	6,30	6,77	7,20	0,0006
%PB	8,34	8,27	7,86	7,99	8,15	8,01	0,0476
%NIDA	4,26	4,57	4,85	3,83	4,93	4,25	0,0405
%FDN	49,06	52,65	52,34	53,15	50,98	51,88	0,0263
%FDA	27,30	29,83	29,87	30,59	29,45	29,79	0,0060
%LDA	3,67	3,90	3,86	3,95	3,99	4,05	0,0959
%ALM	19,92	S/D	26,32	23,07	19,66	23,63	0,2428
%MO	93,71	93,93	94,12	93,84	93,75	93,96	0,4187
%DIVMS	64,89	64,14	63,63	62,02	62,40	63,30	0,0254

Como se puede apreciar las variables analizadas tales como, densidad, %MS 105 °C, pH, %LDA, %ALM y %MO no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tiempos de apertura del ensilaje de maíz.

El N-NH₃(%/Nt) presentó diferencias significativas, aunque el análisis de los valores no muestran una tendencia estable a medida que avanza el

tiempo de ensilado, a diferencia de lo observado para el sorgo, o los antecedentes de otros autores como Hoffman *et al.* (2011), Kung *et al.* (2014), entre otros.

La proteína y el NIDA también presentaron diferencias entre momentos de apertura, pero no guardan relación clara con el tiempo de conservación.

Para el caso de la FDN y FDA también se observan diferencias estadísticamente significativas entre los distintos momentos evaluados sin mostrar un patrón consistente, similar a lo informado por Young *et al.*, (2012), quienes observaron en un material variaciones similares, pero sostenían que en general esto no es habitual y que no debiera haber cambios significativos en la fibra, tal lo hallado por otros autores como Kung *et al.* (2014), Hoffman *et al.* (2011).

Al igual que en los microsilos de sorgo evaluados, el valor de ALM del maíz, no presentó diferencias estadísticamente significativas, a pesar de ser uno de los valores que se esperaba que en términos relativos se incrementara.

Para el análisis de producción de gas se utilizaron los periodos I y III debido a que en el transcurso del período II se produjo un corte de energía eléctrica a las 55 horas de muestreo, motivo por el cual se decidió no tener en cuenta esos datos.

La muestra incubada de alfalfa, obtuvo un patrón normal y acorde a lo esperado.

Cabe destacar que los residuos obtenidos luego de realizado el análisis no se procesaron, ya que en los resultados de los patrones de la cinética de producción de gas no se encontraron las diferencias esperadas.

En la Tabla 3 se presentan los resultados obtenidos en producción de gas *in vitro* para el ensilaje de planta entera de sorgo.

Para cada fecha se muestra el valor de la media obtenida de cada parámetro y el P-valor. Puede verse que para los parámetros que describen y caracterizan la dinámica de producción de gas *in vitro* (A, b y Lag) no se detectaron diferencias significativas entre ensilajes de sorgo con distintas extensiones de conservación.

Tabla 3. Parámetros del modelo no lineal desarrollado por France *et al.*, (1993) que describen la cinética de producción de gas, media obtenida y P valor para cada apertura de silaje de sorgo.

VARIABLES	MESES					P
	2	6	8	10	12	
A	224	218	217	221	218	0,6773
B	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,3647
LAG	1,36	1,15	1,18	1,25	1,23	0,4864

A (asíntota del modelo (ml/g MO incubada)), b (tasa de fermentación (h⁻¹)), lag (tiempo de retardo en que se inicia la fermentación (h)), t (tiempo de incubación (h)).

En la Figura 4 se presenta el patrón de fermentación mediante la gráfica de la producción de gas acumulada en el período I y III para todas las fechas de apertura del ensilaje de planta entera de sorgo.

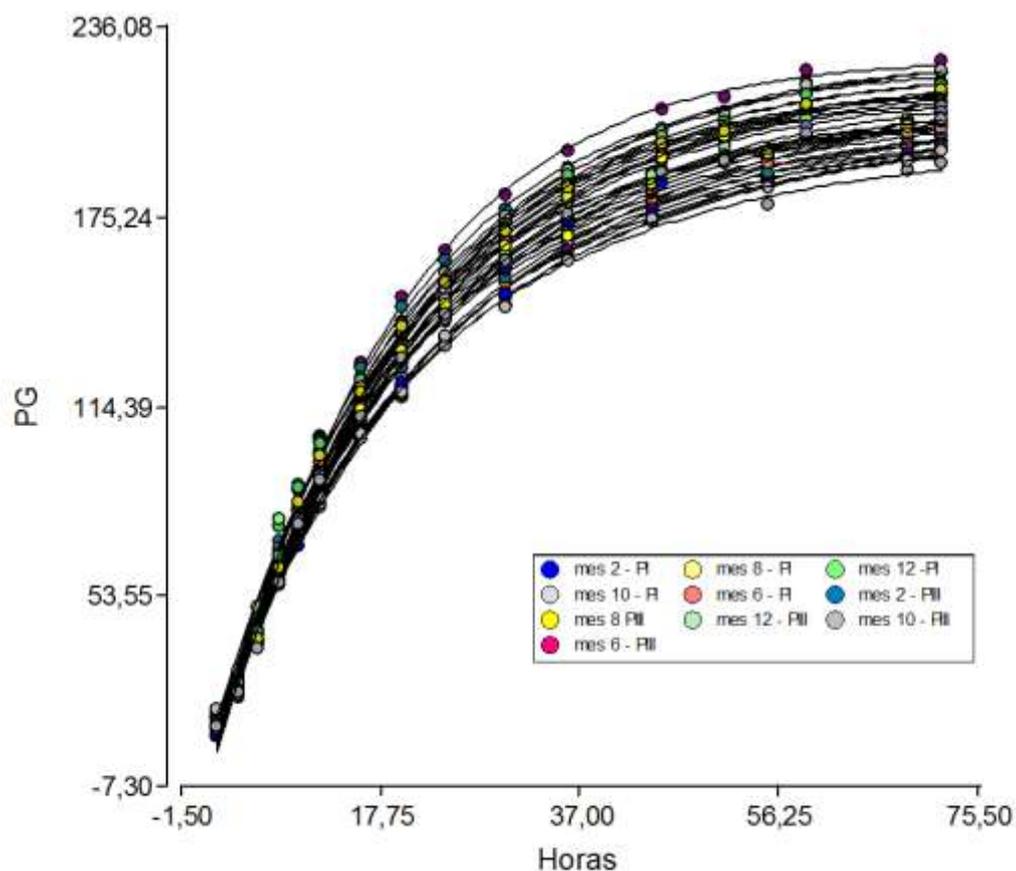


Figura 4. Producción de gas *in vitro* de ensilaje de sorgo para todas las fechas de apertura a diferentes horas de incubación.

Si bien no se define una tendencia como en los resultados obtenidos en maíz se aprecian indicios de cambios en la disponibilidad del ALM presente. Esto puede deberse a que la matriz proteica del grano de sorgo es más desarrollada y compacta que la de un grano de maíz como lo mencionan, Chandrashekar y Mazhar (1999), (citado por Montiel *et al.*, 2004).

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos, para las variables analizadas en la prueba de gas y digestibilidad, para las muestras de silaje de planta entera de maíz. Para cada variable y cada fecha se muestra el valor de la media obtenida de las repeticiones realizadas y el P-valor.

Similar a lo observado con ensilaje de sorgo, no se detectaron diferencias entre fechas de conservación para la PG a tiempo infinito (A) ni para la tasa de fermentación (b). Mientras que a diferencia de lo observado con sorgo, en maíz si se observa una disminución en el tiempo de demora en iniciar la fermentación (Lag) a mayor tiempo transcurrido desde la confección del ensilaje.

Esta disminución en Lag podría deberse a un debilitamiento en la matriz proteica que recubre el grano de maíz, haciendo que el ALM esté más fácilmente accesible para ser fermentado más rápido, pero esto no fue evidente al observar los valores N-NH₃, que indicarían la ruptura de estructuras proteicas en maíz. Por el contrario, esto si fue evidente en sorgo, pero no se manifestó en una disminución de Lag. Lo cual resulta difícil de explicar, ya que la matriz proteica del grano de sorgo es más desarrollada y compacta que la del grano de maíz (Chandrashekar y Mazhar (1999), citado por Montiel *et al.*, 2004).

Si bien esto no fue evidente en este trabajo, otros autores (Hoffman *et al.*, 2011), también afirman que existen ciertos procesos de proteólisis que afectarían en cierta medida a la matriz proteica que envuelve al ALM dejando al mismo más expuesto para ser utilizado por parte de las bacterias ruminales.

Tabla 4. Parámetros del modelo no lineal desarrollado por France *et al.*, (1993) que describen la cinética de producción de gas, media obtenida y P valor para cada apertura de silaje de maíz.

VARIABLES	MESES					P
	2	6	8	10	12	
A	250,86	248,52	242,05	245,49	249,6	0,2023
B	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,1952
LAG	1,28	1,27	1,19	1,12	1,04	0,0112

A (asíntota del modelo (ml/g MO incubada)), b (tasa de fermentación (h⁻¹)), lag (tiempo de retardo en que se inicia la fermentación (h)), t (tiempo de incubación).

En la figura 5 se muestra los valores obtenidos de producción de gas acumulado que describen el patrón de fermentación del ensilaje de planta entera de maíz.

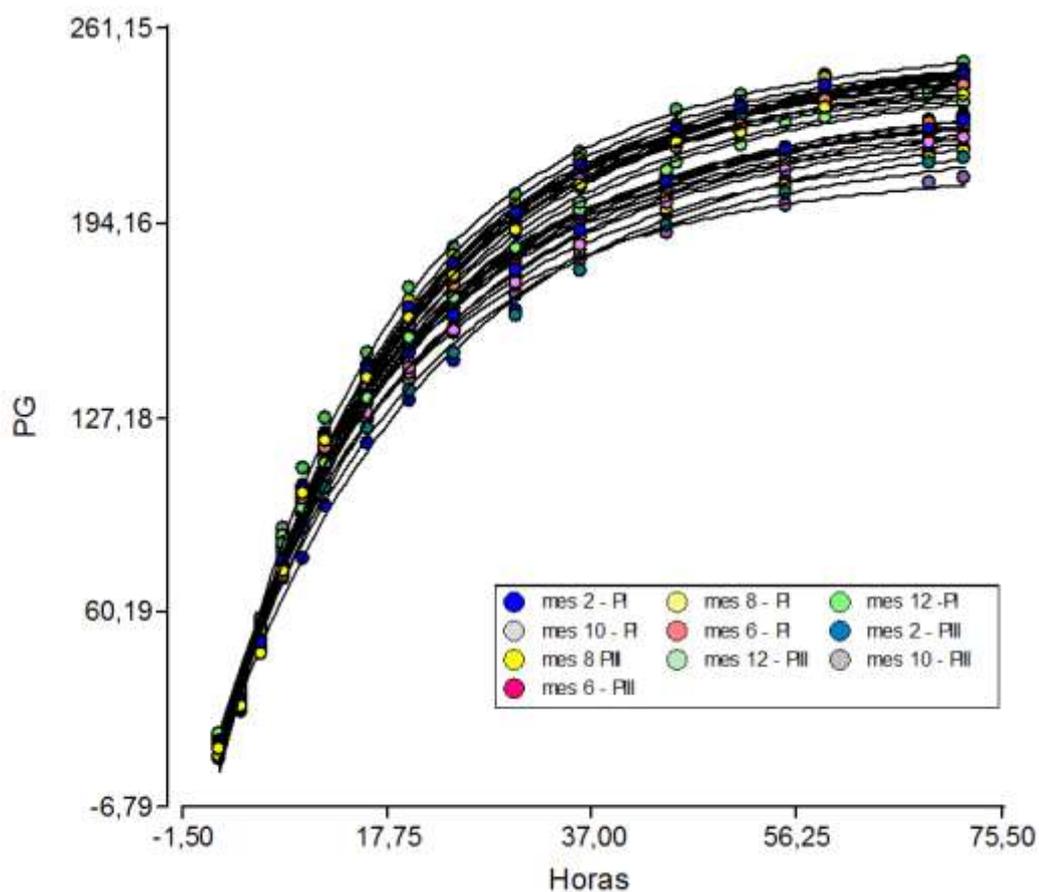


Figura 5. Producción de gas *in-vitro* de ensilaje de maíz para todas las fechas de apertura a diferentes horas de incubación.

Analizando las variables se puede apreciar cambios en función al tiempo de ensilado que si bien no son bien marcados dan indicios de que se ha alterado la matriz proteica que envuelve al gránulo de ALM. En cuanto a la variable A, no se observan diferencias estadísticamente significativas al igual que en la B.

Para el caso del LAG, este sí presenta diferencias significativas lo cual indica que a pesar de no haber diferencias en el resto de las variables hay cambios que han permitido un acceso al ALM en menor tiempo por parte de las bacterias ruminales. Esto apoya lo expuesto por otros autores como Hoffman *et al.* (2011), quienes afirman que existen ciertos procesos de proteólisis que afectarían en cierta medida a la matriz proteica que envuelve al ALM, dejando al mismo más expuesto para el uso por parte de las bacterias ruminales.

7 CONCLUSIONES

La calidad química de los silajes de planta entera de maíz y sorgo varía a lo largo del tiempo, especialmente en el contenido de N-NH₃, el cual se ve incrementado de manera directamente proporcional al tiempo de ensilaje. Este parámetro, es un indicador de procesos proteolíticos activos durante la fase estable del silaje que exceden a los ocurridos durante la fase aeróbica del mismo.

La capacidad fermentativa se ve afectada en función al tiempo de ensilaje, ya que los parámetros que describen la cinética de producción de gas podrían mostrar indicios de gránulos de ALM menos encapsulados y más fácilmente disponibles para el acceso por parte de las bacterias ruminales.

8 CONSIDERACIONES FINALES

Cabe destacar que de acuerdo a la zona en la cual se desarrolle el estudio puede que los resultados finales obtenidos difieran entre distintas investigaciones, como lo aclara Young en uno de sus trabajos, ya que ante diferentes temperaturas del medio ambiente en donde se desarrolle la investigación, los procesos biológicos pueden verse afectados.

Es de fundamental importancia que se siga investigando y profundizando sobre el tema en cuestión. Conocer más sobre cómo se comportan y varían los silajes en función al tiempo de almacenamiento es de gran importancia, especialmente bajo las nuevas tendencias de alimentación las cuales apuntan a que la mayor parte de la MS consumida provenga de forrajes conservados.

9 BIBLIOGRAFÍA

Abdelhadi, L. 2007. Los silajes en la producción animal: importancia de la calidad. Memorias XI Seminario Manejo y utilización de pastos y forrajes en sistemas de producción animal. UPEL, Barquisimeto, Venezuela. (Disponible en: http://www.avpa.ula.ve/eventos/xi_seminario/Conferencias/Articulo-12.pdf. Consultado 18/jun/2013).

Bragachini, M., Cattani, P., Noguera, E. 2001 Mecanización de los forrajes conservados. (Disponible en: http://www.produccionanimal.com.ar/prduccion_y_manejo_reservas/reservas_en_general/08forrajes_conservados.pdf. Consultado 20/dic/ 2014).

Bragachini, M.; Cattani, P.; Gallardo, M.; Peiretti, J. 2008. Forrajes conservados de alta calidad y aspectos relacionados al manejo nutricional.

Cattani, P., 2015. Extracción y suministro de silaje. (Disponible en: http://inta.gob.ar/documentos/extraccionysuministrodesilaje/at_multi_download/file/INTA%20Extracci%C3%B3n%20y%20Suministro%20de%20silaje.pdf. Consultado 28/abr/2015).

Clemente, G., Monge, J.L., Martinengo, J.P. 2012. Evaluación de silajes de sorgo inoculado en la ganancia peso de vaquillonas holando argentino. (Disponible en: http://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/ganancia_peso_vaquillonas_con_silaje_sorgo_inoculado.pdf. Consultado 25/ago/2013).

D'Amours, L. y Savoie, P. 2005. Density profile of corn silage in bunker silos. Canadian biosystems engineering, 47(2), 2-21.). (Disponible en: <http://www.csbescgab.ca/docs/journal/47/c0435.pdf>. Consultado 21/dic/2013).

Der Bedrosian, M., C., Nestor, K., E., Kung, L., 2012. The effects of hybrid, maturity, and length of storage on the composition and nutritive value of corn silage. J. Dairy Sci. 9 5: 5115–5126.

Di Rienzo, J ., Casanoves, F ., Balzarini, MG, González, L ., Tablada, M ., Robledo, C. Infostat, versión 2008, Facultad de Ciencias Agropecuarias (FCA), Universidad Nacional de Córdoba: Córdoba, Argentina, 2008.

Fernández Mayer, A. 1999. Silaje de planta entera, Cap. I: 4-11. EEA INTA Bordenave.

Fernández Mayer, A. 2011. Impacto de los silajes de planta entera (maíz o sorgo) en los sistemas de engorde intensivo (pastoril y a corral). (Disponible en: http://inta.gob.ar/documentos/impacto-de-los-silajes-de-planta-entera-maiz-o-sorgo-en-los-sistemas-de-engorde-intensivos-pastoril-y-a-corral/at_multi_download/file/27.%20engorde_intensivo.pdf. Consultado 19/nov/2014).

France, J., Dhanoa, M.S., Theodorou, M.K., Lister, S.J., Davies, D.R., Isac, D. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. *J. Theor. Biol.* 163: 99–111.

Gallardo, M. 2007. El valor de los alimentos. (Disponible en: http://rafaela.inta.gov.ar/info/documentos/nutricion/nutricion_valordealimentos.htm. Consultado 12/ene/2015).

Hallada, C. 2009. Why new corn silage doesn't feed as well. *Hoard's Dairyman*. 154(19): 712. (Disponible en: <http://qualitysilage.com/PDF/C-Hallada-Why-new-corn-silage-Hoards-111009.pdf>. Consultado 18/jun/2013).

Hoffman, P. C. y Shaver, R. D. 2009. A Guide to Understanding Vitreousness and Prolamins in Corn. (Disponible en: http://www.uwex.edu/ces/dairynutrition/documents/FGESProLaminGuidev2.0_000.pdf. Consultado 16/ene/2015).

Hoffman, P. C., Esser, N. M., Shaver, R. D., Coblenz, W. K., Scott, M. P., Bodnar, A. L., Schmidt, R. J.; and Charley, R. C. 2011. Influence of ensiling time and inoculation on alteration of the starch-protein matrix in high-moisture corn. (Disponible en: <http://digitalcommons.unl.edu/usdaarsfacpub/860>. Consultado 16/ene/2015).

Hoffman, P. C. y Shaver, R. D., 2015. A Guide to Understanding Vitreousness and Prolamins in Corn. (Disponible en: https://shaverlab.dysci.wisc.edu/wp-content/uploads/sites/87/2015/04/FGES-ProLaminGuidev2.0_000.pdf. Consultado 16/ene/2015).

Holden, L.A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.* 82:1791-1794.

Holmes, B. J., & Muck, R. E. 2008. Packing bunker and pile silos to minimize porosity. *Focus on Forage*, 10(1), 1-2. (Disponible en: http://www.midwestforage.org/Events/meeting_2012/Packing%20Bunker%20and%20Pile%20Silos%20to%20Minimize%20Porosity%20-%20Holmes.pdf. Consultado 16/ene/ 2015).

Holmes, B. y Muck, R. 1999. Summary of Factors Affecting Silage Density in Bunker Silos. Minnesota/Wisconsin. (Disponible en: <http://www.bbe.umn.edu/extens/enotes/ensum99/summary.html>, consultado 20/dic/ 2014).

INTA – Secretaría de Agricultura y Ganadería de la Nación. 1987. Carta de suelos de la República Argentina. Hoja 3163-32. Oncativo.

Jaurena, G. y Wawrzkievicz, M. 2013. Guía de procedimientos analíticos. Programa para el mejoramiento de la evaluación de forrajes y alimentos centro de investigación y servicios en nutrición animal. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Vol. 10.

Jaurena, G. 2008. Contribución de la inoculación bacteriana a la fermentación de silajes de planta entera de maíz y sorgo. *Revista Argentina de Producción Animal*. 28(1): 21-29. (Disponible en: <http://aapa.org.ar/archivos/revistas/2008/vol28n1/003PPJaurena.pdf>. Consultado 19/oct/2013).

Kung, L., Windle, M. C., Walker, N. 2014. The effect of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of high-moisture corn. *J. Dairy Sci.* 97:1707–1712.

McCleary, B. V., Gibson, T. S. y Mugford, D. C. 1997. Measurement of Total Starch in Cereal Products by Amyloglucosidase- α -Amylase Method: Collaborative Study. *J. AOAC International*, 80, 571-579. (Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/275658877_McCleary_B_V_Gibson_T_S_and_Mugford_D_C_1997_Measurement_of_Total_Starch_in_Cereal_Products_by_Amyloglucosidase-a-Amylase_Method_Collaborative_Study_J_AOAC_International_80_571-579

Montiel, M.D., Elizalde, J.C. 2004. Extracción e identificación de prolaminas de sorgo de diferentes variedades. (Disponible en:

http://produccionovina.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_granos/13-montielElizalde.pdf. Consultado 18/jun/2013).

Nocek, J.E., Hart, S.P., Polan, C.E. 1987. Rumen Ammonia Concentration as Influenced by Storage Time, Freezing and Thawing, Acid Preservative, and Method of Ammonia Determination. *J. Dairy Sci.* 70:601-607.

Royo, L., Secanell, E. 2012. Confección y calidad de silajes. (Disponible en: http://inta.gob.ar/documentos/confeccion-y-calidad-de-silajes/at_multi_download/file/INTA_Confecci%C3%B3n_y_calidad_de_silajes.pdf. Consultado 15/ene/2015).

Tilley, J.M.A., Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. *J. Br. Grassland Soc.* 18:104-111.

Van Olphen, P., Dalla Valle, D., Ferrero, J., Gutierrez, L.M., Viviani Rossi, E., 2004. Maíz: contenido de grano y calidad del silaje. (Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/147-maiz.pdf. Consultado 15/nov/2014).

Weinberg, Z. G. y Muck, R. E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiol. Rev.* 19(1):53-68.

Windle, M. C., Walker, N., Kung, L. 2014. Effects of an exogenous protease on the fermentation and nutritive value of corn silage harvested at different dry matter contents and ensiled for various lengths of time. *J. Dairy Sci.* 97 :3053–3060.

Young, K. M., Lim, J. M., Der Bedrosian, M. C., Kung, L. 2012. Effect of exogenous protease enzymes on the fermentation and nutritive value of corn silage. *J. Dairy Sci.* 95:6687–6694.