

PROTEOLISIS EN LOS ENSILADOS Y SU VALORACION

Por M.^a E. de la Concha Vázquez (1)
M.^a C. Carpintero Gigosos (2)

I. Efecto de diferentes conservadores sobre la proteolisis en ensilados de gramíneas y leguminosas

INTRODUCCION

En una planta en crecimiento, del 75 al 90 por ciento de su nitrógeno total se encuentra en forma de proteína. Inmediatamente después de ser cortada, las proteasas de la propia planta hidrolizan las proteínas, a compuestos nitrogenados, y en unas 12 a 24 horas, de un 20 a un 25% del nitrógeno total es convertido en nitrógeno no proteico.

Ohyama^{10, 11}, encontró que en el dactilo después de cinco días de marchitado, la proteolisis habría alcanzado el 50 por ciento, mientras que cuando el forraje se ensiló rápidamente después de cortada la planta, la proteolisis sólo alcanzó el 12 por ciento en el mismo periodo de tiempo.

Debido a los procesos proteolíticos, el nitrógeno no proteico que representa aproximadamente de un 20 a un 25 por ciento del total de los compuestos nitrogenados en los forrajes verdes, puede llegar a constituir entre el 50 y el 80 por ciento del nitrógeno total¹⁴. El contenido en nitrógeno no proteico se vio que aumentaba durante un periodo de 12 a 14 horas después de ensilado de 200 g./Kg. N.T. a 400 g./Kg. N.T.³. Kemble⁵ encontró que el 60 por ciento del nitrógeno total estaba como nitrógeno no proteico a los 16 días de ensilar la hierba en ausencia de microorganismos.

El pH óptimo para la actividad de las proteasas de la planta es del orden de 5.0 a

(1) Dpto. de Producción Animal.

(2) Estación Agrícola Experimental del C.S.I.C. León.

6.0. Macpherson⁶ ha encontrado que la obtención de un pH de 4.3 durante el ensilaje, evita una posterior proteólisis; pero más recientemente Carpintero y col.⁴ encontraron que aplicando directamente un ácido, para alcanzar en el ensilado un pH inicial bajo, esta proteólisis quedaba restringida pero no eliminada.

Además de la hidrólisis de las proteínas a compuestos nitrogenados por las enzimas de las plantas, puede darse una ruptura de aminoácidos, particularmente los ácidos glutamínico y aspártico, son degradados por la acción de las decarboxilasas de la propia planta.

MATERIAL Y METODOS

a) Preparación del ensilado

El forraje, formado por tres leguminosas: alfalfa (*Medicago sativa* var. Europa), trébol blanco (*Trifolium repens* var. California Ladina) y trébol violeta (*Trifolium pratense* var. Páramo) y 4 gramíneas: dactilo (*Dactylis glomerata* var. Lana roskilde), festuca elevada (*Festuca arundinacea* var. Raba), ray-grass inglés (*Lolium perenne* var. Belida) y ray-grass italiano (*Lolium multiflorum* var. Sabalan), proceden de un primer corte anual, en primavera, de praderas temporales en experiencia situadas en la Estación Agrícola Experimental de León.

El material, una vez segado en el campo, fue trasladado inmediatamente al laboratorio y troceado con tijera a un tamaño aproximado de 10 mm.

Una muestra media de cada especie fue ensilada, por duplicado en microsilos experimentales (capacidad aproximada de 100 gramos cada uno). El forraje se empaquetó cuidadosamente procurando eliminar la mayor cantidad posible de aire en su interior.

El tubo de vidrio fue cerrado con tapón de goma perforado por un dispositivo plastificado en forma de «trap», cuyo cierre con agua permite el escape del gas desprendido en la fermentación y evita la entrada de aire del exterior. De esta forma se mantienen dentro del silo las condiciones anaerobias esenciales para una buena fermentación durante el tiempo que dura la experiencia.

Los silos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 61 días. Una vez abiertos se tomaron muestras de cada uno de ellos para su análisis. Los resultados vienen expresados en la tabla I.

b) Métodos analíticos

Forrajes: La Materia seca (M.S.) fue determinada por desecación en estufa de aire forzado a 105°C, hasta peso constante. El contenido en carbohidratos solubles en agua fue determinado por el método de Barnett² sobre el forraje sin secar, para ello se realizó la extracción sobre 25 gramos de material recién cortado con 200 ml. de agua fría en un microtriturador durante cinco minutos. Una vez filtrada la solución a través de tres capas de gasa, se precipitó la proteína sobre una parte alícuota (100 ml.) añadiendo 5 ml. de ácido sulfúrico 0.1 N, y llevando la solución a ebullición. Una vez fría, se filtró de nuevo a través de papel Watman n.º 242 y se continuó sobre la solución la determinación colorimétrica con antrona, utilizando como patrón glucosa.

Ensilados: La determinación de la materia seca se realizó liofilizando la muestra previa congelación a -25°C.

La determinación del pH, carbohidratos solubles y nitrógeno volátil (N-NH₃) fue realizada sobre ensilado recién sacado del silo. El resto de las determinaciones se hi-

cieron sobre muestra seca liofilizada. La medida del pH se hizo sobre maceración acuosa de la muestra con un pH-metro Radiometer. El contenido en carbohidratos solubles se determinó de igual forma a como se describe para los forrajes, previa neutralización de la parte alícuota tomada de la extracción acuosa para evitar que una acidez demasiado baja hidrolizase las fructosanas de las gramíneas.

El nitrógeno total (N-total) fue determinado por el método de Kjeldahl, el nitrógeno volátil (N-NH₃) nitrógeno soluble (N.S.) en agua caliente y nitrógeno proteico (N-prot.), fueron determinados por los métodos de McPherson descritos por McDonald⁷.

Se llevaron a cabo dos experimentos para ver el efecto de algunos tratamientos sobre la proteólisis en ensilados de gramíneas y leguminosas.

Experimento 1

El trébol blanco, procedente del último corte anual en otoño, y con un contenido en materia seca (M.S.) de 170 g./Kg. y 41.2 g./Kg. de carbohidratos solubles (M.S.) fue ensilado por duplicado para cada tratamiento.

Se emplearon silos de laboratorio de 1.5 Kg. de capacidad. Estos silos van cerrados a ambos extremos con tapones de goma perforados por sendos tubos. El inferior cerrado mediante una llave, permite la salida del efluente producido antes de abrir el silo, y el superior deja escapar el gas carbónico producido en la fermentación, que en este caso es recogido en una solución saturada de hidróxido de bario que actúa además como cierre de la entrada de aire.

Los tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- Testigo (sin aditivo).
- Calor (1 hora a 60°C).
- Formaldehído: 4 l/t de formalina, equivalente a 6 gramos de formaldehído puro/100 g. P.B.

La solución de formalina (solución de formaldehído al 40%) fue esparcida regularmente sobre una muestra que se ensiló inmediatamente. Una cantidad equivalente al volumen de formalina utilizada, fue adicionada de agua, en el silo testigo y calentado.

Los silos, mantenidos a temperatura ambiente, fueron abiertos después de 82 días, y analizados.

Sobre el material recién extraído del silo fue determinado el contenido en M.S. por liofilización y las fracciones nitrogenadas y de carbohidratos solubles por los métodos descritos anteriormente.

Los resultados vienen expresados en la tabla II.

Experimento 2

Se eligieron dos especies diferentes de plantas, ray-grass italiano (*Lolium multiflorum* var. Sabalan) y trébol violeta (*Trifolium pratense* var. Páramo), que se ensilaron con distintos conservadores. Se intentaba comparar el efecto de éstos en la fermentación y conservación de la proteína.

Ray-grass con 146.5 g./Kg. de materia seca y un contenido en carbohidratos solubles de 156.9 g./Kg. M.S., y trébol violeta con 149.7 g./Kg. de materia seca y un 75.4 g./Kg. (M.S.) de azúcares solubles fueron ensilados en muestra doble en microsilos de 80 gramos de capacidad. El material, inmediatamente de ser cortado y troceado en el laboratorio fue tratado con el conservador y posteriormente ensilado.

Para cada una de las especies fueron aplicados seis tratamientos distintos. Estos fueron los siguientes:

- Acido fórmico.
- Acido fórmico + formaldehído.
- Acido fórmico + calor (1 hora a 55°C).
- Acido fórmico + calor (1 hora a 110°C).
- Calor (1 hora a 55°C).
- Calor (1 hora a 110°C).

No se consideró un tratamiento testigo sin conservador ya que, dado que el contenido de azúcares de los forrajes era bajo, principalmente en las leguminosas, las diferencias en los ensilados tratados con el testigo lógicamente serían siempre grandes, por ello el efecto de los conservadores se estudiará comparándolo con el tratado con ácido fórmico.

Las dosis de los conservadores, ácido fórmico y formaldehído, fueron diferentes para cada especie. Estas dosis fueron las siguientes:

Gramínea:

- Acido fórmico: 3.3 l/t (ácido del 85%).
- Formalina: 6.6 l/t (4.9 g. de formaldehído/100 g. P.B. del forraje).

Leguminosas:

- Acido fórmico: 6.6 l/t (ácido del 85%).
- Formalina: 6.6 l/t (8,5 g. de formaldehído/100 g. P.B. del forraje).

El tratamiento con calor fue siempre previo a la adición del conservador. Las muestras troceadas y metidas en bolsas de plástico fueron colocadas en estufas a distintas temperaturas: 55 y 110°C, durante una hora. Una vez fuera el conservador fue esparcido sobre la muestra caliente y ensilada.

Estos silos fueron abiertos después de 68 días. Sobre dicho material se determinó materia seca, carbohidratos solubles (sobre muestra liofilizada) y diversas fracciones nitrogenadas.

Los resultados se expresan en la tabla III.

RESULTADOS Y DISCUSION

b) Métodos analíticos

La composición química de los forrajes y ensilados analizados vienen dados en las tablas I, II, y III.

Los contenidos altos en M.S. de algunas de las leguminosas y gramíneas, es consecuencia del estado de madurez avanzado de la planta y esto podría explicar un valor bajo para los carbohidratos solubles. No obstante, y dado que se trata de un primer corte único en primavera, el nivel de azúcares solubles es bastante elevado, sobre todo en los tréboles. La alfalfa, sin embargo se encontraba ya en estado muy avanzado de floración y ello se reflejó en un bajo contenido en carbohidratos, insuficientes para una buena conservación sin aditivos.

Hemos de destacar la diferencia entre el ray-grass inglés y el italiano respecto a su contenido en azúcares. En este último, a su mayor contenido por su propia diferenciación, se une el debido al estado vegetativo más joven, puesto de manifiesto en un contenido en M.S. más bajo.

Los contenidos en M.S. de los ensilados son, en general, ligeramente inferiores a los del forraje original. En los ensilados de alfalfa y trébol blanco, el nivel de azúcares no fue suficiente para una buena fermentación y esto se tradujo en un valor de pH elevado sobre todo en la alfalfa y en pérdidas de nitrógeno en forma amoniacal que resulta-

ron muy elevadas en el caso del trébol blanco. Con el trébol violeta, el incremento de azúcares iniciales del forraje tuvo un efecto positivo en la conservación, obteniéndose valores de pH más bajos y un 40% de los carbohidratos iniciales. La proteólisis fue menor para las otras dos leguminosas, aunque las pérdidas de N-NH₃ se sitúan ligeramente por encima del límite máximo (11-12%) que algunos autores consideran indicativo de una fermentación adecuada.

En los ensilados de gramíneas el contenido elevado en M.S., sin una disminución considerable del nivel de carbohidratos, ha sido el factor que ha orientado positivamente la conservación. Los valores altos de pH alcanzados indican poca actividad de las bacterias del ácido láctico y aunque un pH < 4.2 es el que generalmente se considera óptimo en los ensilados de gramíneas de bajo contenido en M.S., cuando ésta se incrementa el pH resultante puede ser más alto aún en ensilados bien conservados. Morgan y col.⁹ en ensilados de mezclas de leguminosa-gramínea con un contenido de 193 g./Kg. M.S. de azúcares, encuentran que al elevarse la M.S. de 175 g./Kg. a 360 el pH se elevaba de 4.0 a 5.0, sin incidir negativamente en la conservación. Los valores de los carbohidratos residuales son altos en los ensilados de ray-grass.

Las pérdidas de nitrógeno en forma amoniacal son pequeñas y el grado de proteólisis es menor que en los ensilados de leguminosas. No obstante, el valor elevado de pH en los ensilados de dactilo se refleja en una pérdida considerable de nitrógeno gaseoso frente a los ensilados de festuca y ray-grass inglés.

No se observaron pérdidas por deterioración del material y aparentemente los ensilados presentaban buen aspecto.

En ausencia de aditivos, una concentración mínima de 150 g./Kg. M.S. de carbohidratos y 200 g./kg. de M.S. son necesarios, según los diversos autores, para el éxito de una buena fermentación de gramíneas. Las leguminosas son más difíciles de ensilar, no sólo porque éstas presentan una actividad tampón más alta y por tanto son más resistentes a descensos de pH. La dificultad con la alfalfa es debida también a la estructura física de la planta que impide una buena compactación.

En el experimento 1 (tabla II) se observa que en los silos sin conservador, forraje con un contenido bajo en M.S. y sobre todo en carbohidratos (41 g./Kg. M.S.), dio lugar al desarrollo de una fermentación de tipo Clostridia como se pone de manifiesto en los valores elevados de nitrógeno amoniacal (192 g./Kg. N.T) y posiblemente, aunque esto no fue analizado, en la formación de cantidades considerables de ácido butírico, cuyo olor característico presentaba el material en el momento de abrir el silo. La actividad proteolítica fue también intensa.

Los tratamientos utilizados, calor y formaldehído, redujeron considerablemente las pérdidas de nitrógeno gaseoso y protegieron significativamente (P > 0.01) la proteína. Este N-proteico, aunque más elevado en los ensilados donde se utilizó el formaldehído, no fue significativamente diferente (P < 0.05) del protegido mediante el tratamiento con calor. El formaldehído preservó considerablemente los azúcares aunque su pH no descendió al nivel que lo hizo con el tratamiento mediante calor.

El formaldehído ha sido utilizado como aditivo^{1, 12, 13}, no sólo por sus propiedades bacteriostáticas, reduciendo la fermentación en el silo, sino también como protector de la degradación de la proteína en el silo y posteriormente en el rumen. El calor, cuando éste se desarrolla dentro del silo, como efecto de la fermentación, tiene efectos negativos en la recuperación de la proteína verdadera. Aplicado posteriormente sobre concentrados de harinas, la protege de su degradación en el rumen. No tenemos información de que haya sido estudiado como tratamiento previo antes de ensilar los forrajes y con resultados positivos, por ello planteamos un segundo experimento en el que este factor aparece como tratamiento y cuyos resultados se dan en la tabla III.

En el experimento 2 (tabla III) el ácido fórmico adicionado como conservador a la gramínea, de bajo contenido en materia seca y carbohidratos, fue insuficiente para conseguir una bajada adecuada del pH en la fermentación del silo y preservar los azúcares, su efecto inhibitor sobre la actividad proteolítica de Clostridia fue bajo y una parte considerable del N-proteico pasó a forma soluble, principalmente amoniaco. Cuando se empleó en mezcla con otros aditivos, formaldehído o calor, el efecto fue más positivo, el pH fue más bajo y los azúcares mejor conservados, siendo éstos especialmente altos en el caso del tratado con formaldehído. La aplicación sólo de calor redujo la formación de nitrógeno gaseoso y dio lugar a un ensilado mejor conservado que el conservado con ácido fórmico.

La proteína del forraje fue significativamente más baja ($P < 0.01$) en los ensilados donde el ácido fue utilizado como conservador que en el resto de los tratamientos. El calor a 110°C fue menos efectivo en la protección de esta proteína ($P < 0.01$) que a 55°C , pero la combinación del ácido y calor a 110°C fue indudablemente el mejor tratamiento, incluso cuando al efecto del ácido se le sumó el del formaldehído o calor a 55°C ($P < 0.05$).

La dosis de ácido utilizada con la leguminosa (6.6 l/t) produjo ensilados bien conservados aún cuando el material de partida era muy pobre en carbohidratos (75.4 g./Kg. M.S.). Los criterios considerados por varios autores⁸ como satisfactorios para un buen ensilado son valores de pH 4.2 y un contenido en $\text{N-NH}_3 < 11$ (expresado como tanto por ciento del N.T.), criterios que en general cumplen estos ensilados. Un mayor desdoblamiento en los azúcares se observó cuando fue aplicado sólo el calor.

La mezcla de ácido-formaldehído empleada protegió eficientemente ($P < 0.01$) la proteína del forraje original comparado con cualquier otro de los tratamientos ensayados. Le siguió en efectividad ($P < 0.05$) el tratamiento con ácido más calor a 110°C .

RESUMEN

Se analizaron diferentes muestras de forraje sin el uso de conservadores: 3 leguminosas (alfalfa, trébol blanco y trébol violeta) y 4 gramíneas (dactilo, festuca elevada, ray-grass inglés y ray-grass italiano).

Estas gramíneas y leguminosas con un contenido en materia seca de 200 g./Kg. o superior y al menos 150 g./Kg. de M.S. de azúcares solubles, dieron lugar a ensilados bien conservados sin el empleo de aditivos.

El ray-grass y el trébol violeta en una 2.^a experiencia fueron ensilados con diferentes conservadores:

- ácido fórmico.
- ácido fórmico y formalina.
- ácido fórmico y tratamiento con calor (a 55°C).
- ácido fórmico y tratamiento con calor (a 110°C).
- calor (a 55°C).
- calor (a 110°C).

El formaldehído y el calor protegieron eficientemente la proteína de su desdoblamiento en el silo.

El formaldehído (5 g./100 g. de P.B.) en el tratamiento ácido fórmico y formaldehído, de la gramínea incrementó su proteína en 230 g./Kg. N.T. En la leguminosa (8.5 g./100 g. de P.B.) este aumento fue sólo de 138 g./Kg.

El efecto del calor como tratamiento fue más efectivo en el caso de la gramínea.

TABLA I
Composición química de forrajes y sus ensilados sin conservador (g./Kg. M.S.) (media de silos duplicados).

	FORRAJE		ENSILADO						
	Materia seca (g/Kg)	Carboh. solubles	M.S. (g/Kg)	pH	Carboh. solubles	N-total	N-Soluble	N-NH ₃ (g/Kg NT)	N-proteico
LEGUMINOSAS									
Alfalfa	259.8	101.6	231.4	5.4	16.3	29.66	23.33	131	210
Trébol blanco	182.8	130.2	185.2	5.0	12.0	38.07	19.69	209	480
Trébol violeta	150.5	163.3	142.5	4.6	65.4	28.06	12.22	148	560
GRAMINEAS									
Dactilo	229.3	135.8	207.1	5.6	19.6	20.57	7.85	136	620
Festuca	265.5	127.4	250.0	5.2	32.1	16.95	5.49	96	670
Ray-grass inglés	286.4	158.2	270.0	5.2	82.9	17.09	5.19	55	690
Ray-grass italiano	233.8	281.0	202.8	5.2	110.4	17.77	4.76	113	730

TABLA II
Composición media de un ensilado de trébol blanco (g./Kg. M.S.)

Tratamientos	M.S.	pH	Carbohidratos solubles	NT	N-NH ₃ (g/Kg N.T.)	N-prot. (g/Kg N.T.)
Testigo	147.4	5.65	6.35	36.00	192	439 ^b
Calor	156.8	5.18	7.50	37.56	99	678 ^a
Formaldehído	151.6	5.93	9.40	41.73	78	769 ^a

a, b.- valores con diferentes subíndices en la misma columna difieren significativamente ($P < 0.01$) -- comparadas por el método de Duncan (STEEL y TORRIE, 1960).

TABLA III
Composición de los ensilados conservados con diferentes tratamientos (g./Kg. M.S.) (medias de silos duplicados).

Tratamiento	ENSILADO						
	M/S. (g/Kg)	pH	Carboh. solubles	N-Total	N-Soluble	N-NH ₃ (g/Kg NT)	N-Proteico
GRAMINEA: Ray-grass italiano							
Acido fórmico	140.2	5.3	13.0	25.69	14.77	124	425 ^B
Acido fórmico + formalina	157.8	4.6	63.2	26.68	9.05	24	660 ^C
Acido fórmico + calor 55°C	156.2	4.6	41.0	24.31	7.90	18	675 ^C
Acido fórmico+calor 110°C	156.2	4.4	34.6	29.98	7.54	14	749 ^C
Calor 55°C	162.8	4.2	18.0	24.31	7.85	42	677 ^C
Calor 110°C	177.8	4.3	11.0	25.01	11.04	24	557 ^B
LEGUMINOSA: Trébol violeta							
Acido fórmico	163.6	4.1	21.4	31.99	11.13	22	652 ^B
Acido fórmico+formalina	169.5	4.1	23.5	30.43	6.41	12	789 ^B
Acido fórmico+calor 55°C	167.5	4.3	25.4	31.59	11.11	16	648 ^B
Acido fórmico+calor 110°C	178.8	4.1	14.3	32.08	8.06	12	751 ^B
Calor 55°C	159.8	4.3	1.0	31.73	11.89	29	625 ^B
Calor 110°C	155.0	5.4	4.2	32.83	11.13	35	661 ^B

a,b,c. Valores con diferentes subíndices en una columna, para cada especie, difieren significativamente (P<0.01)

PROTEIN BREAKDOWN IN SILAGES TO PREDICT THE NUTRITIVE VALUE OF SILAGES

I. Grass and legumes silages preserved without additives. Effects of different treatments affecting protein breakdown of these silages.

SUMMARY

The aim of this study was to see the effect of some additives on the nutritive value of silages by its effect on the protein protection.

This work contain two different parts: on one hand we study the chemical composition of 7 types of forrages conserved without additives. These forrages were 3 legumes (*Medicago sativa* var. Europa, *Trifolium repens* var. California ladina and *Trifolium pratense* var. Páramo) and 4 grasses (*Dactylis glomerata* var. Lana roskilde, *Festuca arundinacea* var. Raba, *Lolium perenne* var. Belida and *Lolium multiflorum* var. Sarbalan). On the other hand we study the effect of some additives on 2 types of forrage,

one grass, italian ryegrass, and one legume, red clover. These additives were: (a) formic acid (b) formic acid and formaline, (c) formic acid and heat treatment (55°C), (d) formic acid and heat treatment (110°C), (e) heat treatment (55°C) and (f) heat treatment (110°C).

On the first experience we got silages well preserved. On the second experience the effect of the formaldehyde and heat treatment on the silages was to protect the protein from its breakdown into the silo. The formaldehyde, on the treatment formic acid and formaldehyde, increased the protein contain plus in of 230 g./Kg. N.T., on the grass, whereas on the leguminous this increase was only about 138 g./Kg.

The effect of the heat treatment was more effective on the grass than on the leguminous.

BIBLIOGRAFIA

- 1) ARNOULD, R. y col. (1978). Le formaldehyde utilisé comme conservateur d'ensilage. I. Comparision de son effect avec celui de l'acide formique pour la conservation du forrage dans le silo. *Rev. de l'Agric.* 31 (1), 80-88.
- 2) BARNETT, A.J.G. y MILLER, T.B. (1950). The determination of soluble carbohydrate in dried samples of grass silage by anthrone method. *J. Sci. Food Agric.* 1, 336-339.
- 3) BERGEN, W.G. y col. (1974). Changes in nitrogenous compounds of the whole corn plant during and subsequent effects on dry matter intake by sheep. *J. Anim. Sci.* 39(3), 629-637.
- 4) CARPINTERO, C.M. y col. (1979). The effect of some pretreatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass and Forage Sci.* 34 (4), 311-315.
- 5) KEMBLE, A.R. (1956). Studies on the nitrogen metabolism of the ensilage process. *J. Sci. Food Agric.* 7, 125-130.
- 6) MCPERSON, H.T. (1952). Changes in nitrogen distribution in crop conservation. 2. Protein breakdown during wilting. *J. Sci. Food Agric.* 3, 363-367.
- 7) MCDONALD, P. y col. (1960). Studies on ensilages. *Tech. Bull. Edinburg School of Agriculture.* 1-83.
- 8) MCDONALD, P. y WHITTENBURY, R. (1973). The ensilage process. En BUTTLER, C.W. y BAILEY, R.W., *Chemistry and Biochemistry of herbage.* Academic Press. London, 3, 33-60.
- 9) MORGAN, C.A., EDWARDS, R.A. y MCDONALD, P. (1980). Intake and matabolism studies with fresh and wilted silages. *J. Agric. Sc. Camb.* 94 (2), 287-298.
- 10) OHYAMA, Y. (1970). On the proteolysis in the leaves of pasture plants. *Jap. J. Zootech. Sci.* 41, 585-592.
- 11) ONYAMA, Y. y MASAKI, S. (1971). Protein breakdown during ensilage with special reference to protein addition and air introduction at ensiling. *Jap. Z. Zootech. Sci.* 42 318-325.
- 12) SIDONS, R.C.; BEEVER, D.E. y KAISER, A.G. (1982). Evaluation of the effect of formic acid and level of formaldehyde application before ensiling on silage protein degradability. *J. Sci. Food Agric.* 33, (7), 609-613.
- 13) SIDONS, R.C. y col. (1984). The effect of formaldehyde or glutaraldehyde application to lucerne before ensiling on silage fermentation and silage N digestion in sheep. *Br. J. Nutr.* 52 (2), 391-401.
- 14) THOMAS, J.C. y col. (1980). Some factors influencing the performance of beef cattle given silage. *Br. Grassld. Soc. Occ. Symp. N° 11, Brighton, 1979, 383-387.*