

EVALUACIÓN FERMENTATIVA DEL ENSILADO DEL SUBPRODUCTO DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus L.*) EN TRES NIVELES DE UN MICROSILO

Fermentative evaluation of the artichoke (*Cynara scolymus l.*) by-product ensilage on three levels of microsililo.

M. Meneses¹, J. Madrid², A. Martínez², F. Hernández², J. A. Gallego², M. D. Megías^{2*}

¹Programa de Ganadería, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Colegio de Postgraduados, km. 36.5 Carretera México-Texcoco, C.P. 56230, Montecillo, Estado de México. ²Departamento de Producción Animal, Univesidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30071 Murcia, España.

*Autor para correspondencia: M^a Dolores Megías. Tel.: +34 968 36 47 48; fax: +34 968 36 41 47. Email: mdmegias@um.es

RESUMEN

Se ha estudiado la evolución de indicadores fermentativos durante 50 días de ensilaje en el subproducto agroindustrial de alcachofa (*Cynara scolymus, L.*). Las muestras se analizaron a intervalos regulares de tiempo (1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 y 50 días), en tres fracciones del microsililo (inferior, medio y superior). El pH se estabilizó en los primeros 12 días de fermentación. El contenido de ácido láctico y acético fue diferente entre los días de fermentación ($p < 0,001$), pero las diferencias entre fracciones no fue significativa. El contenido de hidratos de carbono solubles fue diferente solo entre los diferentes días de ensilaje ($p < 0,001$). Los resultados demuestran que no existen cambios estadísticamente significativos entre las fracciones evaluadas demostrando un buen nivel fermentativo del ensilaje. Se puede concluir que el subproducto crudo de alcachofa es un material muy idóneo para ser conservado mediante ensilaje.

Palabras clave: ensilaje, subproducto, fermentación, alcachofa, *Cynara scolymus*.

ABSTRACT

The fermentative indicators evolution has been studied during 50 days of silage in the agro-industrial artichoke by-product (*Cynara scolymus, L.*). The samples were analyzed at different sampling days (1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 and 50), in three fractions of the microsililo (botton, medium and top). The pH stabilized in the first 12

days. The lactic and acetic acids content was different between the sampling days ($p < 0.001$), but the differences between fractions were not significant. Water soluble carbohydrates content was different between the different ensiling days ($p < 0.001$). No changes on pH have found and lactic or acetic acids and water soluble carbohydrates between the fractions evaluated. We can conclude that crude artichoke by-product will be suitable to be conserved by ensilage.

Key words: silage, by-product, fermentation, artichoke, *Cynara scolymus*.

INTRODUCCIÓN

Los cambios bioquímicos durante el proceso el ensilaje producidos por microorganismos son importantes, ya que permiten valorar la producción de ácidos orgánicos provenientes de la fermentación de carbohidratos solubles del forraje o subproducto vegetal, garantizando su conservación durante periodos prolongados. Los ácidos acético y láctico producen descensos en el valor del pH durante el proceso fermentativo, impidiendo el desarrollo de microorganismos indeseables que provocarían putrefacción y olor desagradable dando lugar a un mal ensilado (Cabanillas y Peñuñuri, 1984). Es importante conocer estos cambios, ya que de ello dependerá que este alimento se conserve en condiciones adecuadas para poder ser consumido por los animales (Cañeque y Sancha, 1998; McDonald et al., 1991). El proceso fermentativo puede variar dependiendo de la especie vegetal a conservar, así como del estado fenológico,

características del cultivo, procesado industrial o realización de tratamientos previos al ensilaje (Watson y Smith, 1984).

Por otra parte, los cambios de hábitos culinarios y los producidos en las dietas de los consumidores europeos hace que cada vez se produzcan más alimentos preparados, transformados o con algún tipo de presentación industrial. Esto unido a la moderna agricultura intensiva provoca altas cantidades de subproductos en épocas del año muy concretas que, de no ser retiradas producen graves problemas medioambientales al tratarse de material rápidamente degradable. Por otra parte, se obtienen elevadas cantidades de subproductos agroindustriales que, en poco tiempo, deben ser retirados de las fábricas y darles un uso alternativo. El ensilaje es un método capaz de conservar la amplia oferta forrajera y posterior aprovechamiento destinándolos a la alimentación de rumiantes en las épocas de producción (Megías et al., 1993). Distintas características hacen que la utilización de estos

Cuadro 1. Composición química del subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L) antes de ser ensilado.

Componente	Contenido (%)
Materia seca	29,79 ± 0,01
Proteína bruta	10,15 ± 0,21
Extracto etéreo	2,27 ± 0,13
Cenizas bruta	5,77 ± 0,26
FDN	42,97 ± 1,40
FDA	31,00 ± 0,36
Hidratos de carbono solubles	5,62 ± 0,01

Cuadro 2. Desaparición de hidratos de carbono solubles en agua (% MS) en tres fracciones del microsilo durante el ensilado del subproducto de alcachofa.

Día	FS	FM	FI	(A)	(N)
0	5,62 ± 0,01 ⁽⁵⁾	5,62 ± 0,01 ⁽⁶⁾	5,62 ± 0,01 ⁽⁶⁾	0,01	NS
1	2,45 ± 0,12 ^{b(2,3)}	0,55 ± 0,33 ^{a(1)}	0,95 ± 0,13 ^{a(2,3)}	0,21	**
2	2,80 ± 0,28 ^{b(3,4)}	0,76 ± 0,62 ^{a(1)}	0,64 ± 0,07 ^{a(2)}	0,40	*
3	4,74 ± 0,44 ^{c(5)}	1,11 ± 0,27 ^{b(1,2)}	0,09 ± 0,02 ^{a(1)}	0,30	***
4	3,61 ± 0,33 ^{c(4)}	2,00 ± 0,12 ^{b(3)}	1,02 ± 0,44 ^{a(3)}	0,20	**
8	1,02 ± 0,82 ^{a(1)}	2,98 ± 0,07 ^{b(4)}	3,58 ± 0,05 ^{b(5)}	0,48	*
12	1,47 ± 0,09 ^{a(1,2)}	3,89 ± 0,09 ^{b(5)}	1,62 ± 0,12 ^{a(4)}	0,10	***
24	3,19 ± 0,98 ^(3,4)	4,50 ± 0,51 ⁽⁵⁾	3,42 ± 0,28 ⁽⁵⁾	0,62	NS
50	0,65 ± 0,12 ⁽¹⁾	1,50 ± 0,28 ^(2,3)	1,21 ± 0,21 ⁽³⁾	0,15	NS
(1)	0,48	0,28	0,13		
(N)	***	***	***		

Números de superíndices diferentes indican diferencias entre los días de muestreo para una misma fracción. Letras de superíndices diferentes indican los grupos diferentes entre las distintas fracciones.

(N) Nivel de significación. *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, NS = No Significativo.

(A) Desviación estándar entre fracciones del microsilo (1) Desviación estándar entre días de muestreo para cada fracción del microsilo.

subproductos en alimentación animal tenga una serie de ventajas interesantes como es el bajo coste de estos subproductos, en muchas ocasiones es solo el precio del transporte; esto unido a las buenas características nutritivas hacen que, el 40% de las granjas de producción de vacuno lechero del sudeste de España usen el subproducto de alcachofa como parte de la dieta en la alimentación de los animales.

El objeto de este estudio fue evaluar el comportamiento fermentativo del subproducto crudo de alcachofa (*Cynara scolymus*, L) medido a tres niveles en microsilos y valorar los cambios bioquímicos ocurridos durante el periodo de fermentación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó el subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus*, L), obtenido del corte manual en

fresco para su limpieza, preparación y posterior procesamiento industrial en la industria conservera de la Región de Murcia, España. El material estaba constituido por restos de tallos, brácteas completas y hojas. El subproducto fue introducido en microsilos con capacidad de 12,5 l según lo descrito por Megías et al. (1993). El muestreo se realizó los días 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24 y 50 de ensilaje; el día 0 correspondió al material antes de ensilar. Cada día de muestreo se obtuvieron tres fracciones: superior (FS), media (FM) e inferior (FI). Las muestras fueron conservadas a -20 °C hasta la realización de los análisis.

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Se utilizaron 20 g de muestra fresca macerando en 100 ml de agua destilada durante 1 hora tras lo cual se midió el pH, con un potenciómetro marca CRISON (Digit - 501). La concentración de hidratos de carbono solubles

en agua (WSC) fue medida por colorimetría mediante el método de antrona descrito por Barnett and Millar (1950). La producción de ácido láctico, también por colorimetría, según la metodología descrita por Taylor (1996) modificada por Madrid et al. (1999a) y, los ácidos grasos volátiles determinados por cromatografía de gases (Madrid et al. 1999b).

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza de una sola vía (Steel et al., 1996) y para establecer las diferencias entre los días de ensilaje y las fracciones del microsilo las medias se compararon mediante la prueba de Tukey. El ajuste de los datos durante el proceso fermentativo se realizó mediante análisis de regresión con el programa Curve Expert 1.37 (Hyams, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la composición química del subproducto de alcachofa antes de ser ensilado recogida en el cuadro 1 (Meneses et al., 2007), se desprende que se trata de un subproducto con alto contenido de fibra y proteína y, bajo en hidratos de carbono, por lo que se le considera como un subproducto fibroso-proteico (Ørskov, 1977).

Evolución del pH

La figura 1 presenta la curva de evolución del pH, ajustada a un modelo de regresión logístico: $y = a/(1 + e^{-cx})$. La tendencia del pH a la estabilización es pausada y ocurre alrededor del día 12. Los valores de r^2 fueron 0,887, 0,8267 y 0,9149 para FS, FM y FI, respectivamente. Es posible que la mayor disminución del pH en la FM y FI fuera favorecida por sus mejores condiciones de compactación, produciendo una mayor concentración de ácidos orgánicos. El retardo en la estabilización del pH se debe al bajo nivel de hidratos de carbono al inicio del proceso fermentativo (5,62 %MS) ralentizando el proceso en los primeros estadios.

Por tanto, la evolución del pH obtenida en este estudio se relaciona con una buena calidad del ensilado. Un factor determinante para la efectividad conservadora del pH en el material vegetal ensilado es el contenido inicial en materia seca. Según Cañeque y Sancha (1998) y McDonald et al. (1991) para forrajes con alto contenido en MS, el pH presenta efectos inhibidores, lo que genera un aumento del pH superior al límite tradicional. El forraje estudiado con un contenido de 29,97 %MS, los valores de pH encontrados están en el intervalo de 4,2 a 4,4, inferior a 5, valor límite propuesto por McDonald et al. (1991) como de un mal ensilado.

Desaparición de hidratos de carbono solubles en agua

La evolución del contenido de hidratos de carbono solubles (WSC) aparece recogida en el cuadro 2, en donde se aprecia su disminución durante el tiempo de ensilaje, si bien este descenso no fue homogéneo en las distintas fracciones del microsilo. Las diferencias no han sido significativas entre las tres fracciones al término de la experiencia, si bien sí se ha producido una reducción significativa ($p < 0,001$) desde el inicio de la misma para las tres fracciones. Esto significa que aunque la velocidad de desaparición es diferente, al final del proceso se produjo una misma utilización de los WSC por parte de los microorganismos presentes, indicando una distinta velocidad de crecimiento microbiano. En la FS existe mayor variabilidad en el contenido de WSC durante los primeros 4 días de ensilaje, ya que en esta fracción el material está más expuesto a la entrada de oxígeno y las condiciones de fermentación no fueron las más adecuadas para el crecimiento de bacterias lácticas, cuya acción es corta y se inhibe cuando el pH es inferior a 4,5, estabilizando el proceso (Cañeque y Sancha, 1998).

No hay que olvidar que el contenido de carbohidratos en las plantas es variable y depende de muchos factores; especie o familia botánica,

Cuadro 3. Producción ácido láctico (% MS) en tres fracciones del microsilo durante el ensilado del subproducto de alcachofa.

Día	FS	FM	FI	(A)	(N)
0	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0	NS
1	0 ⁽¹⁾	0,02 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,02 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,02	NS
2	0,04 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,03 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,04 ± 0,01 ⁽¹⁾	0,01	NS
3	0,04 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,04 ± 0,02 ⁽¹⁾	0,04 ± 0,02 ⁽¹⁾	0	NS
4	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0 ⁽¹⁾	0	NS
8	0,49 ± 0,01 ⁽²⁾	0,48 ± 0,01 ⁽²⁾	0,48 ± 0,02 ⁽²⁾	0,01	NS
12	3,10 ± 0,08 ⁽³⁾	2,87 ± 0,08 ⁽³⁾	2,76 ± 0,07 ⁽³⁾	0,08	NS
24	3,50 ± 0,02 ^{c(4)}	3,25 ± 0,02 ^{b(4)}	2,70 ± 0,02 ^{a(3)}	0,02	***
50	2,07 ± 0,19 ⁽⁵⁾	1,95 ± 0,17 ⁽⁵⁾	1,93 ± 0,17 ⁽²⁾	0,18	NS
(1)	0,07	0,06	0,06		
(N)	***	***	***		

Números de superíndices diferentes indican diferencias entre los días de muestreo para una misma fracción. Letras de superíndices diferentes indican los grupos diferentes entre las distintas fracciones.

(N) Nivel de significación. *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$, NS = No Significativo.

(A) Desviación estándar entre fracciones del microsilo. (1) Desviación estándar entre días de muestreo para cada fracción del microsilo.

condiciones climáticas, nivel de fertilización y lo más importante, el estado de desarrollo de la planta. Cuanto más precoz es la planta, mayor contenido de azúcares (Church, 1984; McDonald et al., 1991; Cañeque y Sancha, 1998). Según Martín (2001), el subproducto de la alcachofa presenta un 10,8 % WSC en las brácteas y un 11,5 % WSC en el corazón, superiores a los obtenidos en este estudio (5,61 %WSC). Esta diferencia podía deberse a que este subproducto además de contener restos de brácteas y corazones, presentó un alto contenido de tallos, donde el contenido de WSC es menor. Hay que tener en cuenta que la heterogeneidad en la desaparición de carbohidratos en las fracciones evaluadas podría indicar la formación de espacios con aire, que no permitieron condiciones homogéneas en cada fracción del microsilo. En este sentido, hay que indicar

que el subproducto de alcachofa es un material con poca densidad y difícil compactación, lo cual se suma a la posible presencia de aire en esta fracción del microsilo, y por tanto, la proliferación de microorganismos deseables para la óptima fermentación, como son los Lactobacilos, no tuvieron las condiciones óptimas para su desarrollo.

Producción de ácidos grasos

La evolución del contenido de ácido láctico en el subproducto de alcachofa ensilado queda recogida en el cuadro 3 e indica que no hubieron diferencias estadísticas significativas entre las tres fracciones evaluadas a lo largo del tiempo que duró la experiencia salvo para el día 24 donde sí se observaron diferencias significativas entre las distintas fracciones ($p < 0,001$).

Cuadro 4. Producción de ácido acético (% MS) en tres fracciones del microsilo durante el ensilado del subproducto de alcachofa.

Día	FS	FM	FI	(A)	(N)
0	0,69 ± 0,07 ^(1, 2, 3)	0,69 ± 0,07	0,69 ± 0,07 ^(1, 2)	0,03	NS
1	0,23 ± 0,33 ⁽¹⁾	1,94 ± 1,13	0,82 ± 0,13 ^(1, 2)	0,68	NS
2	0,82 ± 0,30 ^(2, 3)	0,65 ± 0,01	0,75 ± 0,06 ^(1, 2)	0,17	NS
3	0,29 ± 0,06 ^(1, 2)	0,39 ± 0,21	0,84 ± 0,09 ^(1, 2)	0,13	NS
4	0,82 ± 0,50 ^(1, 2, 3)	0,60 ± 0,31	1,43 ± 0,16 ^(2, 3)	0,36	NS
8	1,20 ± 0,10 ^(3, 4)	1,22 ± 0,72	1,74 ± 0,24 ^(3, 4)	0,44	NS
12	1,64 ± 0,07 ^{c(4)}	1,02 ± 0,04 ^b	0,64 ± 0,02 ^{a(1)}	0,05	***
24	2,32 ± 0,19 ⁽⁵⁾	1,29 ± 0,90	2,41 ± 0,87 ⁽⁴⁾	0,73	NS
50	0,90 ± 0,28 ⁽³⁾	1,77 ± 1,21	1,09 ± 0,32 ^(1, 2, 3)	0,74	NS
(1)	0,25	0,68	0,33		
(N)	***	NS	***		

Números de superíndices diferentes indican diferencias entre los días de muestreo para una misma fracción. Letras de superíndices diferentes indican los grupos diferentes entre las distintas fracciones.

(N) Nivel de significación. *** = $p < 0,001$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,05$,

NS = No Significativo.

(A) Desviación estándar entre fracciones del microsilo. (1) Desviación estándar entre días de muestreo para cada fracción del microsilo.

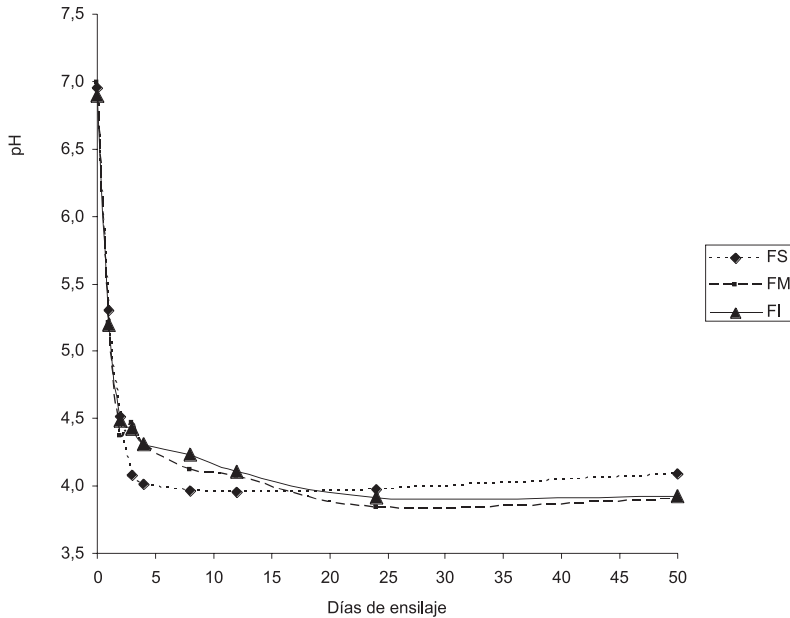
Hay que hacer constar la aparición de una mayor concentración en la FS que en la FI a lo largo de todo el tiempo que duró la experiencia. Los resultados para la FS estarían relacionados, según Cañeque y Sancha (1998), con un desarrollo de microorganismos anaeróbicos facultativos, coliformes, que pueden desarrollarse en presencia de oxígeno y estarían ligados a la falta de anaerobiosis por compresión inadecuada del silo en las primeras fases del ensilaje. Produciéndose, así, un comienzo más tardío en la acidificación del ensilado en las FM y FI.

De los ácidos propiónico y butírico sólo se encontraron trazas al realizar el análisis cromatográfico. El ácido acético (cuadro 4) presentó diferencias significativas ($p < 0,001$) entre las fracciones evaluadas para todos los días de muestreo, a excepción del día 12. Por otra parte y contrario a lo observado en FS y FI, no existieron diferencias significativas en la concen-

tración de ácido acético encontrada para FM. De la misma forma que ocurrió con el ácido láctico, se detectó una mayor concentración en la FS que en la FI durante todo el proceso, si bien el incremento en la cantidad de ácido acético fue anterior al aumento del ácido láctico, lo que indica una secuencia lógica de producción de ácidos orgánicos durante la fermentación (McDonald et al., 1991).

La desaparición de los WSC se relaciona de manera inversamente proporcional a la aparición de ácido láctico, cuya producción se inició a partir del octavo día de ensilaje y al aumento de otros ácidos orgánicos como el acético lo que induce a que hay presencia de bacterias lácticas heterofermentativas, las cuales utilizan los WSC como fuente de energía, dando como productos finales algunos metabolitos como etanol y otros alcoholes, no estudiados en el presente trabajo (McDonald et al., 1991).

Figura 1. Evolución del pH en el ensilaje de subproducto de alcachofa, medido en tres fracciones diferentes de microsilo.



Valores inferiores menores al 2% de ácido acético (Dulphy and Demarquilly, 1981) y al 5% de ácido butírico (Bjorge, 1996) son considerados como cantidades máximas para ensilados de calidad buena a excelente. En ensilados de alcachofa cocida se encontraron valores superiores a 2,7 % MS a los 48 días (Megías et al., 1991) y de 3,9 % MS (Megías et al., 1993) y 4,9 % MS (Megías et al., 1997) a los 100 días de ensilaje. La determinación de la concentración de ácido acético en el ensilado es, además importante, por el efecto que su presencia tiene sobre la disminución del apetito de los animales (Cañeque y Sancha, 1998).

CONCLUSIÓN

El subproducto ensilado de alcachofa mostró buena aptitud para ser ensilado, olor agradable

y buenas características visuales. Sin embargo, este subproducto tiene un alto contenido en fibra y poca densidad por lo que se hace difícil su compactación; esto hizo que las variables evaluadas mostraran diferencias entre las distintas fracciones del microsilo a lo largo del proceso de ensilaje. No obstante, el subproducto se estabilizó después de 12 días, alcanzando un pH de 4,2 al final del proceso, momento en el que las condiciones de ensilaje son muy similares en las diferentes fracciones del microsilo reflejando estabilidad del ensilado y buena calidad de conservación.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México por otorgar la beca para estudios doctorales en el extranjero, al becario 94669.

Así como a Don Ángel Alegría de la empresa "Hijos de Bienvenido Alegría, C. B" por suministraros el subproducto de alcachofa.

BIBLIOGRAFÍA

- Barnett A.J.G., Millar T.B. 1950. The determination of soluble carbohydrate in dried sample of grass silage by anthrone method. *J. Sci. Food Agric.* 1: 336-339.
- Bjorge M. 1996. Evaluating silage quality. <http://www.agric.gov.ab.ca/crops/forage/silage/silag2.html>. 7-2-2002.
- Cabanillas C.R., Peñuñuri M.F. 1984. Rancho N° 16, Clave RA0016. <http://www.patrocipes.uson.mx/patrocipes/invpec/ranchos/RA0016>
- Cañeque M.V., Sancha S.J.L. 1998. Ensilado de Forrajes y su empleo en la Alimentación de Rumiantes. Ediciones Mundiprensa-Madrid. 206 pp.
- Church D.C. 1984. Alimentos y Alimentación del Ganado. Tomo 1. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. pp
- Dulphy J.P., Demarquilly C. 1981. Prévision de la valeur nutritive des aliments des Ruminants: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 36: 113-115.
- Hyams D.G. 2005. Curve Expert version 1.37, for Windows. Copyright 2005 all right reserved. <http://www.curveexpert.webhop.biz>].
- Madrid J., Martínez-Teruel A., Hernández F., Megías M.D. 1999a. Comparative study on determination of lactic acid in silage juice by colorimetric, high-performance liquid chromatography and enzymatic methods. *J. Sci. Food Agric.* 79: 1722-1726.
- Madrid J., Megías M.D., Hernández F. 1999b. Determination of short chain volatile fatty acids in silages from artichoke and orange by-products by capillary gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 79: 580-584.
- Martin D.C. 2001. Inflorescencias comestibles: las alcachofas. <http://www.personal.redestb.es/martin/horta/htm.02-4-2001>.
- McDonald P., Henderson A. R., Whittenbury R. 1968. The effect of temperature on ensilage. *J. Sci. Food Agric.* 17: 476-480.
- McDonald P., Henderson A.R., Heron S.J.E. 1991. The biochemistry of silage. 2nd edition. Chalcombe Publications, Marlow, Bucks, UK.
- Megías M.D., Cherney J.H., Cherney D.J.R. 1997. Effects of phenolic compounds in cell walls of orange and artichoke by-product silages on In vitro Digestibility. *J. Appl. Anim. Res.* 12: 127-136.
- Megías M.D., Martínez T.A., Gallego J.A., Doménech V. 1991. Estudio comparativo del subproducto de alcachofa (*Cynara scolymus* L.) con diferentes aditivos. *AN. VET. (Murcia)* 6-7: 101-105.
- Megías M.D., Martínez T.A., Gallego J.A., Oliver P. 1993. Fermentative and nutritive changes during artichoke (*Cynara scolymus* L.) by product ensilage. *Biores. Technol.* 43: 237-239.
- Meneses M., Megías M.D., Madrid J., Martínez-Teruel A., Hernández F., Oliva J. 2007. Evaluation of the phytosanitaries, fermentatives and nutritives characteristics in the use of the silage of crude artichoke (*Cynara scolymus*, L.) by-product for ruminants feeding. *Small Rum. Reser.* 70, 292-296.
- Ørskov E.R. 1977. Nutritional principles and evaluation of by-products, waste products and new feeds for ruminants. *Liv. Prod. Sci.* 4: 165-175.
- Steel R.G.D., Torrie J.H., Dickey D. 1996. Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach, McGraw Hill, USA.
- Taylor A.C.C.K. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 49-58.
- Watson J.S., Smith M.A. 1984. El ensilaje. 9^a impresión, Ed. Continental, S. A. de C. V. México.