

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Efecto de la aplicación de proteasas exógenas sobre la fermentación y valor nutritivo del ensilado de brócoli

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Médico
Veterinario Zootecnista

Autores:

Fátima Berenisse Aguilar Villa

Diana Mercedes Mera Quito

Director:

Andrés Norberto Haro Haro

ORCID:  0000-0002-1808-325X

Cuenca, Ecuador

2024-09-27

Resumen

La producción y consumo de brócoli aumenta rápidamente, generándose residuos durante y después de la cosecha y la manufactura, residuos que en su proceso de eliminación generan contaminación ambiental por fermentación aeróbica generando gases contaminantes. Después de la selección y antes de la comercialización del brócoli, se desechan las piezas que no cuentan con los niveles y estándares de mercadeos adecuados, desechos que podrían ser utilizados en la incorporación de dietas para animales de interés pecuario. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la inclusión de varias dosis de una enzima proteasa exógena como tratamiento de conservación del brócoli. Los contenidos de materia seca, proteína bruta, fibra bruta y extractos libres de nitrógeno del brócoli fresco fueron mayores ($P < 0,05$) que el brócoli conservado solo y con inclusión de una proteasa. Los contenidos de la pared celular del brócoli en planta entera antes de la conservación a 45 días fueron mayores que las muestras conservadas con y sin inclusión de una proteasa. Los nutrientes digestibles totales y los valores energéticos del brócoli conservado mostraron diferencias ($P < 0,001$) en la planta entera de brócoli como en las muestras ensiladas. Por otro lado, la calidad del ensilado no fue afectada por la inclusión de la proteasa, no obstante, su valoración no llegó a los parámetros de alta calidad, este resultado se da por el bajo contenido de materia seca en el proceso de conservación. Por lo tanto, se concluye que la inclusión de una enzima proteasa exógena puede ser un aditivo apto para la preservación de brócoli hasta los 45 días de almacenamiento.

Palabras clave del autor: ensilado de brócoli, subproductos agroindustriales, enzimas proteasas



El contenido de esta obra corresponde al derecho de expresión de los autores y no compromete el pensamiento institucional de la Universidad de Cuenca ni desata su responsabilidad frente a terceros. Los autores asumen la responsabilidad por la propiedad intelectual y los derechos de autor.

Repositorio Institucional: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Abstract

The production and consumption of broccoli increases rapidly, generating waste during and after production and manufacturing, waste that in its elimination process generates environmental pollution through aerobic fermentation, generating polluting gases. After selection and before marketing the broccoli, the pieces that do not have the appropriate marketing levels and standards are discarded, waste that could be used in the incorporation of diets for animals of livestock interest. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of including various doses of an exogenous protease enzyme as a conservation treatment of broccoli. The contents of dry matter, crude protein, crude fiber and nitrogen-free extracts of fresh broccoli were higher ($P < 0.05$) than broccoli preserved alone and with the inclusion of a protease. The cell wall contents of whole plant broccoli before 45-day preservation were higher than samples preserved with and without inclusion of a protease. Total digestible nutrients and energy values of preserved broccoli showed differences ($P < 0.001$) in the whole broccoli plant and in the ensiled samples. On the other hand, the quality of the silage was not affected by the inclusion of the protease, however, its assessment did not reach the high-quality parameters, this result is due to the low dry matter content in the conservation process. Therefore, it is concluded that the inclusion of an exogenous protease enzyme can be a suitable additive for the preservation of broccoli up to 45 days of storage.

Author Keywords: broccoli silage, agro-industrial by-products, protease enzymes



The content of this work corresponds to the right of expression of the authors and does not compromise the institutional thinking of the University of Cuenca, nor does it release its responsibility before third parties. The authors assume responsibility for the intellectual property and copyrights.

Institutional Repository: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/>

Índice de contenido

Resumen	2
<i>Palabras claves del autor:</i> ensilado de brócoli, subproductos agroindustriales, enzimas proteasas	2
Abstract	3
<i>Author Keywords:</i> broccoli silage, agro-industrial by-products, protease enzymes	3
Índice de contenido	4
Índice de tablas	6
Índice de figuras	7
Dedicatorias	8
Agradecimiento	9
1. Introducción	10
2. Objetivos	12
2.1. Objetivo General	12
2.2. Objetivos específicos	12
3. Hipótesis	12
4. Revisión bibliográfica	13
4.1. Antecedentes y cultivos de brócoli en Ecuador	13
4.2. Uso, transformación y residuos agrícolas.	13
4.3. Características de los subproductos agrícolas y agroindustriales.	15
4.4. Ensilaje	16
4.5. Tipos de silos.	17
4.6. Uso de subproductos agrícolas como materia prima en la elaboración de ensilados.	19
4.7. Enzimas proteolíticas en la conservación del brócoli.	20
4.8. Inclusión de silos de brócoli en la alimentación de los rumiantes.	20
5. Materiales y métodos	22
5.1. Ubicación del estudio experimental	22
5.2. Brócoli y elaboración de silos experimentales	22
6. Resultados y discusión	26
6.1. Composición química del brócoli y brócoli ensilado con proteasas exógenas	26
6.2. Valor energético del brócoli y el ensilado de brócoli	28

6.3. Características sensoriales y parámetros fermentativo del ensilado de brócoli.....	29
7. Conclusiones	31
8. Recomendaciones	32
Referencias	33
Anexos:	39

Índice de tablas

Tabla 1 Unidades experimentales y aditivos utilizados para la conservación del brócoli.	23
Tabla 2. Valores medios de la composición química de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa.	26
Tabla 3 Composición química de la pared celular de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa.	27
Tabla 4 Valores medios de los nutrientes digestibles totalmente y el valor energético de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de Poultrygrow 250 ®.....	28
Tabla 5 Valores medios de las características sensoriales y parámetros fermentativo del ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa.....	29

Índice de figuras.

Figura 1. Los residuos agrícolas generados después de la manufactura 14

Figura 2 Picado del material a un tamaño de partícula (entre 1,5 y 3,5 cm, barra roja y barra negra, respectivamente, IDEAGRO, 2024). 16

Figura 3 Tipos de silo, a) Subterráneo, b) tipo torre, c) bolsa y d) bunker (American Wáter Chemicals, 2024). 18

Figura 4 Ubicación geográfica y Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Tomado de Google Earth, 2020) 22

Dedicatorias

Dedico este trabajo de investigación a quienes han sido mi luz y fortaleza a lo largo de todo este camino académico: María Villa y Jesús Aguilar padres excepcionales y amorosos que me enseñaron la perseverancia, responsabilidad y amor al hacer las cosas, Victoria y Saúl Aguilar mejores hermanos y compañeros que me pudo dar la vida, a mi abuelita Fanny que desde pequeña también supo guiarme a cumplir mis metas, a mi Maki que nunca se separó de mi lado en las noches en vela.

Aguilar Villa Fátima B.

Este trabajo de investigación se lo dedico a Dios, primeramente, quien es la guía de mi vida y que en los momentos más difíciles no me dejó desmayar, también se lo dedico a mis padres Wilson y Patricia que son mis ángeles en el cielo que siempre cuidan de mis pasos. A toda mi familia a mis tíos Fernando y Mercy que fueron los pilares base para mi formación estudiantil, mi tío Francisco que me enseñó lo mejor de esta profesión y a mi tía Cecilia por ser como mi mamá y que de una u otra manera supieron guiarme por el camino del bien, y apoyarme siempre; a todos mis tíos, mis primos, a Eduardo, Sonia y a todos mis abuelitos que ante la falta de mis padres nunca me dejaron sola y me apoyaron siempre.

Mera Quito Diana M

Agradecimiento

Agradezco a Dios por darme salud y fuerza para alcanzar otra meta, a mis padres y hermanos quienes han sido el pilar fundamental desde que empecé a recorrer este camino llamado vida y sin dudar han depositado su confianza en mí. Este logro es tan suyo como mío. A nuestro tutor Ing. Andrés Haro que por su guía experta y paciencia nos ayudó a cumplir con nuestro trabajo. Me siento afortunada de haber contado con su guía. A nuestros revisores Dr. Juan Ramón, Ing. Pedro Nieto y Dr. Raúl Guevara, por el trabajo en equipo; y finalmente agradezco cada experiencia, risa y llanto que en el camino viví y transité siendo éstos los que me trajeron hasta donde me encuentro ahora.

Aguilar Villa Fátima B.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento primeramente al Ing. Andrés Haro por brindarme su amistad, apoyo constante y desinteresado, sus valiosos consejos y su inquebrantable paciencia, fue fundamental para el desarrollo y la culminación de este trabajo de titulación, al Ing. Pedro Nieto, Dr. Juan Ramón y Ing. Raúl Guevara por el apoyo para la culminación de este trabajo de titulación, a Diego por su ayuda y apoyo a lo largo de todo este trabajo de titulación, y por ultimo y no menos importante agradezco a toda mi familia por su amor incondicional, su comprensión y apoyo en los momentos más difíciles durante todo el proceso de mi vida universitaria, su confianza en mí y sus palabras de aliento han sido mi mayor motivación.

Mera Quito Diana M.

1. Introducción

El brócoli (*Brassica oleracea var. italica*) es una verdura de la familia de las crucíferas al igual que el repollo, coliflor y nabo. Su contenido nutricional en proteínas, fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y grasas es de 20, 22, 13 y 5 %, respectivamente (De Evan *et al.*, 2020), se le considera una materia prima ideal para la incorporación en la alimentación de los animales de interés pecuario, sobre todo en la incorporación de la alimentación de ganado bovino y ovino (Haro *et al.*, 2019). En el Ecuador, la producción de brócoli se ha incrementado de 1,7 mil Tm durante el año 2016 a más de 4,0 mil Tm para el 2024, demostrando ser una verdura de fácil cultivo y rápido desarrollo, alrededor de las 14 semanas hasta su cosecha (Gutiérrez y Villacis, 2023).

Ecuador es un gran productor de esta verdura, por ejemplo, en la provincia de Cotopaxi, Pichincha y Chimborazo se implantan los cultivos, nominando a estas provincias como las de mayor producción, entre el 60 y 70% de producción generada en el país, así mismo, las provincias de Tungurahua, Imbabura, Azuay, Cañar y Loja los acompañan con un 40% de la producción total (Duque y Murillo, 2021), (INEC, 2021), (Gutiérrez y Villacis, 2023).

Se entiende que esta producción genera una gran cantidad de residuos después de la selección antes de la comercialización del brócoli, en estos procesos de manufactura se desechan las piezas que no cuentan con los estándares de comercialización adecuados y sus fracciones como el tallo, hojas y la inflorescencia, generando alrededor de 998 Tm de residuos (Gutiérrez y Villacis, 2023). Por lo que, estos despojos, al descomponerse mediante procesos naturales, generan un impacto ambiental significativo. Durante la fermentación aeróbica, se producen gases contaminantes como CO₂ y CH₄, que son importantes contribuyentes al calentamiento global (Rodríguez *et al.*, 2019; Haro *et al.*, 2020). Estos gases no solo afectan el cambio climático, sino que también pueden tener repercusiones negativas en la calidad del aire y en los ecosistemas circundantes. Por lo tanto, es crucial implementar estrategias efectivas para la gestión y tratamiento de estos desechos, con el fin de mitigar su impacto ambiental y promover prácticas más sostenibles.

Estudios actuales (De Evan *et al.*, 2020, Drabińska *et al.*, 2022) muestran que la utilización del brócoli en la alimentación de animales de interés pecuario, sobre todo en la alimentación de los rumiantes, incorporando esta verdura hasta un 30% en remplazo de cereales de alto costo como el maíz, a más de contribuir a la reducción del impacto ambiental por la generación de residuos durante su manufactura. En la actualidad, la alta generación de residuos de brócoli y su baja

digestibilidad en animales rumiantes, hace que se tomen alternativas de preservación de la verdura y tratamiento de la fibra, respectivamente (De Evan *et al.*, 2020). Entre las alternativas, ensilar ha demostrado ser una técnica adecuada para preservar y obtener una mejor digestibilidad de la fibra en el brócoli (Der Bedrosian y Kung, 2019, De Evan *et al.*, 2020).

Al mismo tiempo, la inclusión de enzimas como aditivos podría mejorar o mantener la composición química de los ensilados. Por ejemplo, las proteasas exógenas aceleran los procesos de fermentación al aumentar la degradabilidad del almidón en el ensilaje de brócoli durante períodos cortos de fermentación. Esto facilita la liberación de carbohidratos solubles, que actúan como principios de activación fermentativa, optimizando la calidad del ensilado y potencialmente mejorando su valor nutricional para los animales. Esta mejora en la fermentación puede resultar en un ensilaje más digestible y con una mayor eficiencia en la conversión de nutrientes, lo que contribuye a una alimentación más efectiva y sostenible (Der Bedrosian y Kung, 2019). Por lo tanto, aplicar enzimas proteasas exógenas en la elaboración de ensilados de brócoli podrían mejorar los parámetros de fermentación y conservación del brócoli.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de la inclusión de varias dosis de una enzima proteasa exógena como tratamiento de conservación del brócoli.

2.2. Objetivos específicos

- Valorar el efecto de la aplicación de diferentes dosis de una enzima proteasa exógena sobre las características físicas y fermentativas del ensilado de brócoli.
- Analizar la composición química del ensilado de brócoli después de 45 días de conservación.

3. Hipótesis

La inclusión de una enzima proteasa exógena como aditivo en la conservación de brócoli podría mejorar o mantener la composición química de los ensilados al acelerar los procesos de fermentación. Este aditivo favorece un aumento en la degradabilidad del almidón durante el ensilaje del brócoli, lo que a su vez libera carbohidratos solubles que actúan como principios de activación fermentativa. Como resultado, el proceso de fermentación se optimiza, lo que puede llevar a un ensilaje de mayor calidad, con una mejor digestibilidad y valor nutritivo para los animales.

4. Revisión bibliográfica

4.1. Antecedentes y cultivos de brócoli en Ecuador.

La *Brassica oleracea var. Italica*, conocida como brócoli es un cultivo importante en el Ecuador, con una creciente demanda en el mercado nacional e internacional, aunque no es originaria de Ecuador, se ha adaptado bien a las condiciones climáticas y topográficas, permitiendo su producción exitosa en varias regiones del país (Le Gall, 2009). El cultivo de brócoli en el Ecuador comienza en el siglo XX, la introducción de la verdura como alternativa rentable para los agricultores, se centraba en la sierra ecuatoriana especialmente en las provincias de Cotopaxi, Imbabura y Chimborazo, en donde las condiciones climáticas templadas eran favorables para la práctica agrícola del brócoli (Burbano, 2023).

El brócoli es cultivado para el mercado nacional y la exportación a países como Estados Unidos, España, Alemania, Perú, Brasil y Chile, el cultivo se lleva a cabo en pequeñas y medianas explotaciones agrícolas, así como en algunas grandes empresas agroindustriales (Ganadería, 2022). Las variedades de brócoli son especies adaptadas a condiciones locales con ciclo de producción que varían según la altitud y clima de cada región; la verdura se siembra principalmente en los meses de abril a septiembre, pero puede variar dependiendo la disponibilidad de agua y condiciones climáticas (Le Gall, 2009).

La producción de brócoli se ha incrementado de 1700 TM en el 2016 a más de 4000 Tm para el 2022 en todo el territorio ecuatoriano. Se demuestra que es una verdura de fácil cultivo, rápido desarrollo (alrededor de 12 y 14 semanas hasta su cosecha) y fácil comercialización (Gutiérrez y Villacis, 2023). La producción se extiende en las provincias de Cotopaxi, Pichincha y Chimborazo se implantan los cultivos, nombrando a estas provincias como las de mayor producción, entre el 60 y 70% de producción generada en el país según (Vélez y Álava, 2021), además, las provincias de Tungurahua, Imbabura, Azuay, Cañar y Loja les siguen con un 40% de la producción total.

4.2. Uso, transformación y residuos agrícolas.

Los residuos agrícolas generados después de la manufactura (Figura 1), suelen ser de cuatro tipos: residuos de cosecha (cascarilla de arroz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar), residuos animales (excrementos, animales muertos), residuos de procesamiento (material de embalaje, latas de fertilizante) y residuos peligrosos (pesticidas, insecticidas) (Seadi & Holm, 2004).

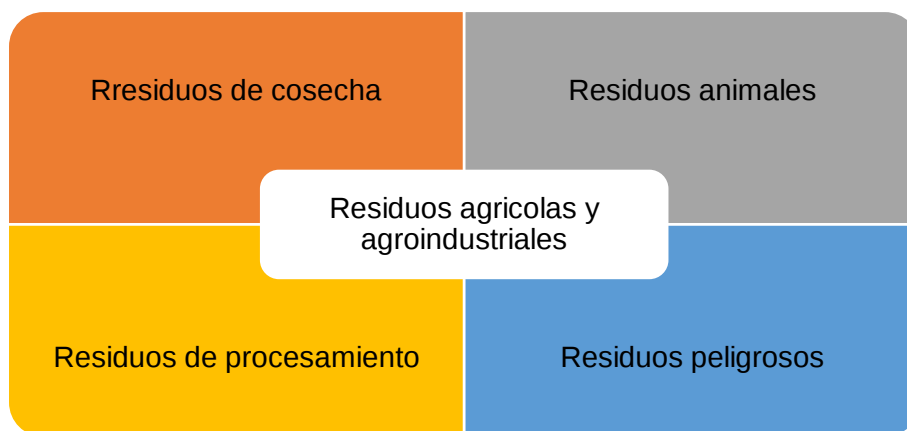


Figura 1. Los residuos agrícolas generados después de la manufactura

El uso de los residuos agrícolas, es una práctica importante sobre las soluciones sostenibles para la gestión de desechos/residuos y la optimización de recursos; estos residuos que incluyen subproductos y materiales no aprovechados directamente en la producción primaria y que pueden ser útiles y beneficios en diferentes áreas de utilización de estos productos. La inclusión en la nutrición animal es una de la opciones, ya que algunos residuos se pueden incorporar a la dieta de animales rumiantes y monogástricos (Haro, 2016, De Evan *et al.*, 2020), aportando nutrientes esenciales como productos fermentados a partir de desechos orgánicos con la inclusión de microorganismos como sustratos y fermentadores, mejorando la digestibilidad, disponibilidad de nutrientes y disminuyendo los factores anti nutricionales, haciéndolos una fuente económica y sostenible de alimento (Afshar y Naser , 2008, De Evan *et al.*, 2020).

Otra forma de aprovechar los desechos es la producción de biocombustibles a partir de bagazo de caña, residuos de maíz y cáscaras de arroz pueden ser fermentados para producir bio etanol y la digestión anaerobia de residuos orgánicos generar biogás, siendo estos biocombustibles una fuente de energía renovable (Trejo *et al.*, 2019). De igual forma, el compostaje manipulando los residuos orgánicos vegetales o animales para producir fertilizantes orgánicos son otras alternativas de utilización de residuos agrícolas, éstos al ser compostados se transforman en humus rico en nutrientes, que mejora la estructura y capacidad de retención de agua en el suelo, así como también mejora la fertilidad y promueve una agricultura sostenible; reincorporando materiales de desecho al ciclo productivo (Fernández *et al.*, 2022).

Los residuos agrícolas pueden ser fuente valiosa de extractos y compuesto bioactivos como antioxidantes, pigmentos y enzimas que pueden ser utilizados en la industria alimentaria,

farmacéutica y cosmética; como cáscaras de frutos cítricos por su contenido de flavonoides y aceites esenciales que pueden ser extraídos y utilizados como ingredientes en productos de alto valor añadido (Bonilla *et al.*, 2023).

4.3. Características de los subproductos agrícolas y agroindustriales.

Los subproductos agrícolas, derivados de la cosecha y procesamiento presentan diversas características físicas que influyen en el manejo, almacenamiento y utilización, también, la densidad y el volumen determinan el espacio necesario para almacenamiento y muy importante el transporte. La humedad, característica importante de los subproductos con alto contenido de agua como pieles de frutas y hojas de vegetales requieren un manejo adecuado para evitar la descomposición y facilitar su transformación en compost o biogás, la textura y tamaño de partícula también varían significativamente, desde partículas finas en salvados de cereales hasta fragmentos más grandes en residuos de cosecha, lo que afecta su procesabilidad y uso en diferentes aplicaciones industriales y agrícolas (Zakarya *et al.*, 2018).

Otra característica, desde la mira pecuaria, los subproductos contienen alto contenido de fibra dietética (sobre el 20% de fibra bruta) que puede ser insoluble como la celulosa y lignina o soluble como las pectinas (Haro *et al.*, 2020); la fibra insoluble es abundante en residuos como el bagazo de caña y la paja de cereales utilizada para producir papel, biocombustibles o como sustrato para digestión anaerobia; por otra parte, la fibra soluble presente en cáscara de frutas, pulpa de vegetales tiene aplicaciones en la industria alimentaria por sus beneficios para la salud digestiva y control de glucosa; adicionalmente estos productos contienen carbohidratos complejos y simples como el almidón y azúcar importantes en la producción de biogás, etanol (Bala *et al.*, 2023).

Algunos subproductos agrícolas, como pulpas de cítricos, cacao y las variedades de banano, contienen proteínas (entre 8 y 27% de proteína bruta), que los hacen valiosos para la alimentación animal y humana, la harina de soya y el salvado de trigo contienen altos niveles de aminoácidos esenciales que se utilizan en la formulación de piensos y alimentos enriquecidos (Haro *et al.*, 2020). Además de las proteínas algunos subproductos como los residuos de la producción de aceites vegetales son ricos en lípidos que incluyen ácidos grasos esenciales como los omegas 3 y 6 utilizados en la industria alimentaria y cosmética (Prandi *et al.*, 2019). Las vitaminas, minerales y compuestos bioactivos; como la vitamina A, C y el complejo B junto con minerales como el calcio, magnesio y zinc están presentes en cáscaras y pulpas de frutas y verduras, los cuales al ser extraídos se pueden utilizar en suplementos dietéticos y alimentos;

así como compuestos bioactivos en industria farmacéutica y cosmética (Enenebeaku *et al.*, 2018).

4.4. Ensilaje.

El ensilaje es un método usado para la conservación de forrajes y otros materiales vegetales que a posterior serán usados como alimento para el ganado bovino durante periodos de escasez de alimento fibroso (Finch *et al.*, 2002). El proceso de elaboración de ensilaje comienza con la cosecha de la planta o material vegetal en su punto óptimo de madurez y calidad nutricional para garantizar un contenido de humedad (no mayor al 50%) adecuado y su óptima fermentación (Muck *et al.*, 2020).

Tras la cosecha, el material se pica en trozos más pequeños a un tamaño de partícula específico dependiendo de la materia prima (1,5 y 3,5 cm de tamaño de partícula Figura 2) para facilitar la compactación y la eliminación del oxígeno en el proceso de ensilaje. La trituración aumenta la superficie de contacto entre el material y las bacterias lácticas que participan en la fermentación. Consecuentemente, el material es ensilado en silos (Figura 4, tipos de silo de la conservación de alimentos fibrosos) donde se compacta firmemente para expulsar el aire y crear un ambiente anaerobio que promueva la fermentación (FAO, 2020; Du *et al.*, 2023).

Consecutivamente, se inocula un aditivo que puede contener cepas específicas de bacterias seleccionadas para acelerar y optimizar la fermentación. Estas bacterias producen ácido láctico, lo que reduce el pH del ensilaje y ayuda a inhibir la proliferación de microorganismos no deseados. Además, se pueden agregar otros aditivos, como melaza o ácido propiónico, para mejorar la calidad del ensilaje y prevenir la aparición de mohos y levaduras (Muck *et al.*, 2018).



Figura 2 Picado del material a un tamaño de partícula (entre 1,5 y 3,5 cm, barra roja y barra negra, respectivamente, IDEAGRO, 2024).

Después de esto, el silo se sella herméticamente para evitar la entrada de aire y prevenir la contaminación. Durante las primeras semanas de almacenamiento, ocurre la fermentación láctica, que reduce el pH del ensilaje y ayuda a conservar su calidad nutricional. Una vez completado el periodo de fermentación, el ensilaje estará listo para alimentar al ganado, proporcionando una fuente de nutrientes de alta calidad durante todo el año (Farina *et al.*, 2021).

4.5. Tipos de silos.

Existe una variedad de silos, cada uno con características y funcionalidades específicas diseñadas para satisfacer diferentes necesidades de almacenamiento entre ellos el almacenamiento y conservación de alimentos de clasificación fibrosa para la alimentación de animales bovinos (Du *et al.*, 2023). Los silos más comunes se clasifican según su forma, material de construcción y uso principal (Figura 4).



Figura 3 Tipos de silo, a) Subterráneo, b) tipo torre, c) bolsa y d) bunker (American Wáter Chemicals, 2024).

El silo de torre o verticales considerado el más tradicional y reconocible. Se caracterizan por ser estructuras altas y estrechas que se elevan verticalmente desde el suelo. Están fabricados con materiales como concreto, acero o incluso madera y se utilizan comúnmente para el almacenamiento de granos, semillas y alimentos secos (Acura, 2023).

Los silos de bolsas consisten en grandes bolsas de plástico reforzado las cuales se llenan con granos, forrajes o ensilajes, se compactan y se sellan. Los silos de bolsa son económicos, fáciles de usar adecuados para pequeñas y medianas explotaciones agrícolas. Una de sus principales ventajas es la hermeticidad: las bolsas son altamente impermeables al aire, lo que inhibe la actividad de microorganismos aerobios, previene la oxidación de nutrientes y reduce la degradación proteica. Como resultado, la conservación de nutrientes es superior en comparación

con otros métodos, y las pérdidas por lixiviación son significativamente menores (Bartosik, et al., 2023).

Los silos tipo bunker son estructuras de almacenamiento de forma rectangular o trapezoidal que se construyen sobre el suelo. Se utilizan comúnmente para ensilaje de forrajes y otros productos agrícolas. Son particularmente para la conservación de grandes cantidades de alimento y permiten un acceso fácil para la extracción del material almacenado, una característica principal en este tipo de silos es la característica del forraje importante para la conservación del material, una adecuada compactación minimiza la presencia de aire la cual se realiza con maquinaria pesada (Horrocks & Vallentine, 1999).

Los silos subterráneos son menos comunes, pero ofrecen una opción de almacenamiento que aprovecha el espacio debajo del suelo. Estos silos proporcionan condiciones de almacenamiento frescas y constantes ideales para ciertos productos alimenticios y materiales sensibles a la temperatura y la humedad (Parray & Mazza, 2009).

4.6. Uso de subproductos agrícolas como materia prima en la elaboración de ensilados.

El uso actual de subproductos agrícolas como materia prima en la elaboración de ensilados es una práctica común en la industria alimentaria y agrícola. Estos subproductos que pueden incluir residuos de cultivos, subproductos de la industria láctea, pulpas de frutas, entre otros pueden ser una excelente fuente de nutrientes y energía para el ganado cuando se ensilan adecuadamente (Dentinho, 2023).

La composición química de los subproductos agroindustriales suele ser ricos en nutrientes, como proteínas, carbohidratos y minerales lo que los hace ideales para su uso como alimento para el ganado y al ensilar estos productos se puede conservar su composición química y hacerlos más disponibles para los animales durante todo el año incluso fuera de la temporada del cultivo (Yafetto et al., 2023). El uso de subproductos agroindustriales en la elaboración de silos ayuda a reducir los desperdicios y promueve la sostenibilidad en la cadena alimentaria en lugar de desecharlos, se les da un nuevo propósito como alimento para ganado lo que contribuye a una gestión más eficiente de los recursos y a la reducción de la contaminación ambiental (De Evan et al., 2020, Dentinho, 2023).

Por lo tanto, los efectos en la calidad del ensilaje cuando se incorporan los subproductos pueden alterar la calidad del material ensilado final, algunos de ellos pueden tener características específicas que afectan a la fermentación y la estabilidad del ensilaje por lo que es importante evaluar su composición y manejo durante el proceso de ensilaje (Hongliang et al., 2022).

Así mismo, definiendo los aspectos económicos en la fabricación e inclusión de subproductos agroindustriales en la elaboración de silos puede tener implicaciones económicas significativas, en muchos casos esto pueden ser una alternativa más económica que los alimentos convencionales, lo que puede ayudar a reducir los costos de alimentación y mejorar la rentabilidad de la producción ganadera (D'Alessandro *et al.*, 2023).

4.7. Enzimas proteolíticas en la conservación del brócoli.

Las enzimas proteolíticas según Santos *et al.* (2023) desempeñan un papel importante en la elaboración de silos, estas enzimas son responsables de degradar las proteínas presentes en las células, catalizan la hidrólisis de los enlaces peptídicos convirtiéndolas en péptidos o aminoácidos más simples lo que influye directamente en la calidad y estabilidad del silo resultante.

Las enzimas proteolíticas como proteasas descomponen las proteínas presentes en el forraje en péptidos y aminoácidos que son fuente esencial de nitrógeno para organismos fermentadores; aunque una proteólisis excesiva puede resultar en la formación de amoníaco elevando el pH del ensilado y comprometiendo su estabilidad (Dunière, 2013).

La actividad de las enzimas puede variar significativamente, dependiendo de factores como estado de madurez del brócoli, las condiciones de ensilaje, y la presencia de microorganismos (De Evan *et al.*, 2020). En el caso específico del brócoli las enzimas proteolíticas intervienen durante el proceso de ensilaje, donde se almacena y fermenta el brócoli para su conservación. La actividad de estas enzimas puede tener un impacto significativo en la textura, el sabor, y la composición nutricional del producto final. Además, la actividad de estas enzimas puede influir en la rapidez y la eficacia del proceso de fermentación que es crucial para la conservación a largo plazo del brócoli ensilado (Haro *et al.*, 2019).

Las enzimas fribrolíticas como las celulasas y hemicelulasas actúan sobre la fibra de la planta descomponiendo la celulosa y hemicelulosa en azúcares simples; al romper la pared celular de las plantas, estas enzimas liberan azúcares fermentables que los microorganismos presentes en el ensilado pueden utilizar para producir ácidos orgánicos, como el ácido láctico esencial para conservar el ensilado debido a que disminuye el pH del mismo. Un pH bajo es muy importante para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables como bacterias butíricas y levaduras (Muck R., 2010).

4.8. Inclusión de silos de brócoli en la alimentación de los rumiantes.

La utilización de silos de brócoli como alternativa de alimentación en rumiantes representa una opción interesante que puede aportar diversos beneficios tanto a los animales como a los productores ganaderos. Los silos de brócoli, elaborados a partir de subproductos agrícolas como tallos y hojas no comerciables para consumo humano, ofrecen una fuente adicional de nutrientes que pueden complementar la dieta del ganado rumiante de manera efectiva (Monllor *et al.*, 2020).

Una de las ventajas es su valor nutricional, es rico en proteínas, con un porcentaje de proteína bruta del 23%, materia seca 14%, fibra cruda 22%, humedad 86%, materia orgánica 88%, cenizas 12% y extracto etéreo 3%, lo que lo convierte en un alimento balanceado y nutritivo para el ganado; la inclusión de este subproducto puede contribuir a mejorar la salud y rendimiento de los animales, así como optimizar la producción de carne o leche (Díaz *et al.*, 2014, De Evan *et al.*, 2020).

La versatilidad de los silos de brócoli en la dieta del ganado nos permite utilizarlos como suplemento alimenticio o como parte integral de la dieta, dependiendo de las necesidades nutricionales y de producción de los animales (Monllor *et al.*, 2020). Además, la utilización de silos de brócoli representa una forma efectiva de aprovechar los subproductos agrícolas lo que contribuye a reducir la cantidad de residuos y promueve la sostenibilidad de la cadena alimentaria.

5. Materiales y métodos

5.1. Ubicación del estudio experimental

El trabajo experimental se realizó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Laboratorio de bromatología, ubicados en la Av. 12 de octubre y Don Bosco.



Figura 4 Ubicación geográfica y Laboratorio de Bromatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Tomado de Google Earth, 2020)

5.2. Brócoli y elaboración de silos experimentales

Los residuos de brócoli generados de los procesos de producción y transformación que fueron utilizados para la elaboración de silos con inclusiones de proteasas exógenas para nuestra investigación fueron obtenidos de ubicaciones aleatorias de los barrios de San Joaquín, en las horas de la mañana, con contenidos de hojas tallo e inflorescencias.

Luego de la obtención de los residuos (planta entera, hojas, tallo e inflorescencia) se picó el brócoli a un tamaño teórico de partícula entre 18 y 25 mm. Se dejó la biomasa vegetal al oreo para que pre-marchite durante 24 horas, de esta manera aumentar su contenido en materia seca antes del ensilaje (importante para la obtención de una buena calidad de producto ensilado).

Se pesaron homogéneamente 500 g de brócoli picado en 5 bolsas por tratamiento. Cada tratamiento (Tabla 1) fue inoculado con una solución tampón de fosfato de 0,1 Molar (5% vol./kg de brócoli fresco y pH de 5,5; EBR0); y 4 tratamientos experimentales fueron inoculados con la misma solución y un amortiguador con proteasa Poultrygrow 250 ® en 20 mg de proteasa/kg de brócoli húmedo (EBR1); con 200 mg/kg de brócoli húmedo (EBR2); con 1000 mg de proteasa/kg de Brócoli húmedo (EBR3); y con 2000 mg de proteasa/kg de brócoli húmedo (EBR4).

Tabla 1 Unidades experimentales y aditivos utilizados para la conservación del brócoli.

Tratamiento ¹	Especificación	Brócoli picado	Proteasa exógena
EBR0	Control, Brócoli ensilado sin inclusión de proteasas	500 g/bolsa	No incluye
EBR1	Brócoli ensilado más la inclusión de proteasas	500 g/bolsa	20 mg/kg
EBR2	Brócoli ensilado más la inclusión de proteasas	500 g/bolsa	200 mg/kg
EBR3	Brócoli ensilado más la inclusión de proteasas	500 g/bolsa	1000 mg/kg
EBR4	Brócoli ensilado más la inclusión de proteasas	500 g/bolsa	2000 mg/kg

¹ EBR0: ensilado de brócoli sin inclusión de una proteasa, EBR1, EBR2, EBR3 y EBR4: ensilado de brócoli con niveles de inclusión una proteasa (Poultrygrow 250), n=25

La proteasa que se utilizó en este experimento fue derivada de la fermentación de *Streptomyces*, proteasa aspártica de grado alimenticio sin actividad fibrolítica o amilolítica. Las soluciones de búffer y la disolución de la proteasa se aplicaron a través de botellas de pulverización durante la mezcla siguiendo los procedimientos de Der Bedrosian y Kung (2019). Finalmente, las bolsas se sellaron y se almacenaron durante 45 días a una temperatura de 24 C°.

5.3. Análisis químicos y características de calidad del brócoli conservado

Transcurridos los 45 días de conservación del brócoli las bolsas fueron abiertas para realizar sus análisis respectivos en el Laboratorio de bromatología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

La composición química del brócoli ensilado, después de su apertura, se analizó de acuerdo con los procedimientos de la (AOAC, 2005) para MS (ID 934.01), cenizas (ID 048.13) y EE (ID 945.16), con excepción del contenido de EE. Las concentraciones de FND, FDA y lignina en los alimentos se determinaron siguiendo los procedimientos de Van Soest et al. (1991), respectivamente. Las concentraciones de NH₃ y el pH del material conservado a 45 días se determinarán según lo descrito por García-Martínez (2005). Todos los análisis químicos se realizarán por triplicado.

Las características organolépticas se midieron con los parámetros de calidad correspondientes al color, olor y textura del material resultante de la conservación siguiendo la metodología de Der Bedrosian y Kung (2019), normalizando al material conservado como excelente, bueno y de mala calidad.

5.4. Cálculos y análisis estadísticos

La valoración de energía se estimó a partir del análisis proximal siguiendo la ecuación matemática (1) descrita por McDowell *et al.*, (1974), donde: EB: Energía Bruta, PB: Proteína Bruta, EE: Extracto Etéreo, FB: Fibra Bruta y ELN: Extractos libres de nitrógeno.

$$EB \text{ (kcal/g)} = 5,72 \left(\frac{PB}{100} \right) + 9,5 \left(\frac{EE}{100} \right) + 4,79 \left(\frac{FB}{100} \right) + 4,7 \left(\frac{ELN}{100} \right) \quad (1)$$

La valoración de la energía neta para bovinos de producción de leche se calculó a partir de las ecuaciones matemáticas disponibles del NRC (2001), donde: ENL: energía neta para bovinos de producción de leche a un nivel de mantenimiento, EM: Energía Metabolizable, EE: Extracto etéreo (2).

$$ENL_p \text{ (Mcal/kg)} = 0,703 \times EM - 0,19 + \left[\left(\frac{0,097 \times EM + 0,19}{97} \right) \times (EE - 3) \right] \quad (2)$$

Los nutrientes digestibles totalmente (NDT) se calcularon utilizando las ecuaciones propuestas por el NRC (2001), basadas en la composición química de los ensilados (3). Este cálculo se realiza a partir de los siguientes parámetros:

$$NDT(\%) = CNS_{td} + PB_{td} + (AG_{td} \times 2,25) + FND_{td} - 7 \dots \dots \dots (3)$$

Donde: CNS_{td} : carbohidratos totalmente digestibles, calculados a una digestibilidad del 98% y un factor de procesado de 94%. PB_{td} : proteína bruta totalmente digestible. AG_{td} : ácidos grasos totalmente digestibles. FND_{td} : fibra neutro detergente totalmente digestible. Siete, es un factor de ajuste por los NDT metabólico fecales.

Por otro lado, la calidad del material conservado se valoró con el Flieg Score y se calculó determinando los valores de calidad del ensilaje en muy buena, buena, media, baja y mala, siguiendo el modelo matemático modificado (4) de Kilics (1986), quien puntúa a la calidad de los forrajes conservados en constante de 220 puntos, se modificó la ecuación a 240 porque se usa verduras por forrajes, entendiéndose que los forrajes tienen mayor contenido de MS hasta el proceso de ensilaje y reposo por oreo. Los valores de calidad del ensilaje se decretarán en 100-

81 puntos: muy buena calidad, 80-61 puntos: buena calidad, 60-41 puntos: media calidad, 40-21 puntos: baja calidad y 20-0 puntos: mala calidad.

$$Flieg\ Score = 240 + (2 \times MS\% - 15) - 40 \times pH \dots \dots \dots (4)$$

Los análisis se realizaron con el paquete estadístico INFOSTAT (2020) se usó un ANOVA de una vía, tomando como efecto fijo al tratamiento. La significancia se declaró en $P < 0,05$, mientras que los valores de $P < 0,10$ se consideraran una tendencia, la comparación de medias se realizaron por la prueba de Tukey.

6. Resultados y discusión

6.1. Composición química del brócoli y brócoli ensilado con proteasas exógenas

La composición química del brócoli como planta entera y el brócoli conservado a 45 día con y sin inclusión de una proteasa exógena se muestra en la tabla 2 y 3. Se observaron diferencias altamente significativas ($P < 0,001$) entre la composición del brócoli fresco y los ensilados comparativos. Los contenidos en humedad fueron menores para los grupos de ensilados, efecto asociado al oreo previo que se facilitó a la materia prima para alcanzar un mínimo de MS antes del proceso de conservación (Der Bedrosian y Kung, 2019).

Tabla 2. Valores medios de la composición química de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa.

Muestra ¹	MS, %	PB, %	EE, %	FB, %	Cz, %	ELN, %
Brócoli	11,0 a	28,7 a	0,97 a	28,8 a	15,8 a	27,5 a
EBR0	9,18 b	23,8 b	2,02 b	20,1 b	18,7 b	29,3 b
EBR1	8,88 bc	25,8 c	1,98 b	19,7 c	19,2 b c	27,3 a
EBR2	8,62 c	25,9 d	1,83 c	19,4 d	19,5 c	27,3 a
EBR3	8,51 c	26,0 e	2,01 b	19,1 e	19,8 c	27,0 a
EBR4	8,53 c	22,4 f	1,89 c	20,3 f	19,8 c	29,5 b
EEM	0,0259	0,0009	0,0005	0,0009	0,0533	0,0567
P valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

¹ MS: materia seca, PB: proteína bruta, EE: extracto etéreo, FB: fibra bruta, Cz: ceniza y CNS: carbohidratos no estructurales. EBR0: ensilado de brócoli sin inclusión de un aditivo, EBR1, EBR2, EBR3 y EBR4: ensilado de brócoli con niveles de inclusión una proteasa Poultrygrow 250. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$). n=3

Los contenidos de la materia seca, proteína bruta, fibra bruta y extractos libres de nitrógeno (MS, PB y FB) del brócoli fresco fueron mayores (11,0, 28,7, 28,8, y 44,7 %, respectivamente) comparados con el brócoli conservado solo y con inclusión de una proteasa (Valores promedio: 25, 20, 19 y 40 %, respectivamente). Sin embargo, los contenidos de grasa y cenizas tras la conservación se incrementaron en 1,0 % y 3,6 % para el brócoli conservado con y sin una proteasa. Los ELN mostraron contenidos diferentes entre muestras de ensiladas con y sin proteasa ($P < 0,001$), sin embargo, el brócoli fresco muestra contenidos similares a los ensilados con diferentes niveles de proteasa, EBR1, EBR2 y EBR3 (27,2% de ELN). Valor promedio: Entre el brócoli fresco y los grupos de muestras ensiladas con y sin una proteasa, se demuestra que a

un nivel de inclusión de EBR3 = 1000 mg/kg de material conservado en fresco no se observan pérdidas del contenido de PB, FB y ELN sobre no incluir este aditivo o incluirlo en EBR4 = 2000 mg/kg de material conservado.

Por otro lado, los contenidos de la pared celular del brócoli en planta entera antes de la conservación a 45 días fueron de 219,8, 13,0 y 1,8 % en fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente (FND, FAD y LAD), respectivamente. Después de la conservación con y sin inclusión de una proteasa exógena se observaron mejores contenidos de FND, FAD y LAD en los silos EBR-0, EBR-1 y EBR-4 en comparación los silos EBR-2 y EBR-3.

Tabla 3 Composición química de la pared celular de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa.

Muestra ¹	FND, %	FAD, %	LAD, %
Brócoli	19,8	13,0	1,80
EBR-0	23,8	13,8	2,91
EBR-1	23,1	13,3	2,54
EBR-2	22,7	13,1	2,39
EBR-3	22,5	13,2	2,17
EBR-4	23,1	14,2	2,95

¹ FND: fibra neutro detergente, FAD: fibra ácido detergente y LAD: lignina ácido detergente. EBR0: ensilado de brócoli sin inclusión de un aditivo y EBR1, EBR2, EBR3 y EBR4: ensilado de brócoli con niveles de inclusión una proteasa Poultrygrow 250

Estos datos concuerdan con ensayos de conservación del brócoli, donde las pérdidas nutricionales de la planta conservada son mínimas, obteniendo concentraciones de PB, FND y EE similares (20, 22 y 5% en base a MS), determinando así la importancia de conservar el brócoli sin alterar esas características bromatológicas propias de la planta (Meneses 2002, Domingo, 2023), así mismo, Molina *et al.* (2004) y Hazard *et al.* (2020), ensilaron maíz y forrajes observando poco detrimento de la composición química del material conservado. Un estudio que incluyó proteasas exógenas en la conservación de maíz, muestra que este aditivo mantiene las

concentraciones de MS (35% de la materia fresca), FND (36% en base a MS), proteína (7,5% en base a MS), manteniéndose constante tras la aplicación del aditivo (Der Bedrosian y Kung, 2019).

6.2. Valor energético del brócoli y el ensilado de brócoli

En la tabla 4, se observa los nutrientes digestibles totalmente (NDT) y el valor energético (EB y ENm) de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa. La inclusión de la proteasa sobre la conservación del brócoli hasta los 45 días mostro diferencias ($P < 0,001$) en la planta entera de brócoli como en las muestras ensiladas entre 72% y 75% de NTD.

La energía bruta y energía neta para el mantenimiento fue diferente ($P < 0,05$) con muestras que presentaron contenidos de EB entre las 3590 Kcal/kg del EBR2 y 3740 Kcal/kg de la planta entera y el EBR3 y EBR4. Similar efecto con la ENm, sin embargo, no incluir un aditivo en la conservación del brócoli como incluirlo sobre los 2000 mg/kg de una proteasa sobre la materia prima conservada puede reducir el aprovechamiento de la energía para el mantenimiento en el ganado bovino, efecto que se atribuye a la conservación y a la actividad de la proteasa sobre la pared celular de brócoli, permitiendo el aporte de nutrientes adheridos a la misma (NRC, 2001, Monllor, 2021). La EB del brócoli fresco en este estudio es mayor que la del brócoli ensilado debido a varios factores relacionados con los cambios que ocurren durante el proceso de ensilaje, como el contenido de MS para el proceso de conservación y posiblemente la fermentación de carbohidratos solubles durante el ensilaje (Der Bedrosian y Kung, 2019).

Tabla 4 Valores medios de los nutrientes digestibles totalmente y el valor energético de la planta entera de brócoli y el ensilado de brócoli con y sin inclusión de Poultrygrow 250 ®

Muestra ¹	NDT, %	EB, Kcal/kg	ENm, Kcal/kg
Brócoli	75,1 a	3740 ab	2300 a
EBR0	72,5 b	3620 ab	2180 b
EBR1	73,2 c	3590 a	2220 c
EBR2	73,4 d	3680 ab	2220 c
EBR3	73,9 e	3740 b	2240 d
EBR4	72,8 f	3740 a	2170 e

EEM	0,01	0,06	0,01
P valor	<0,001	0,026	<0,001

¹ NTD: nutrientes digestibles totalmente, EB: energía bruta, ENm: energía neta para mantenimiento: error estándar de la media. Medias con una letra común no son significativamente diferentes (P > 0,05). n=3.

6.3. Características sensoriales y parámetros fermentativo del ensilado de brócoli

En la tabla 5 se observa las características sensoriales y parámetros fermentativo del ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa. Incluir o no una proteasa exógena en la conservación del brócoli no afectó (P > 0,05) el color (anexo R) ni la estructura del material ensilado hasta los 45 días. A diferencia de olor que se percibió olores dulces correspondientes a una buena calidad de ensilado en las muestras EBR0, EBR1, EBR2 y EBR4, sobre una calidad media con un olor ácido, que muestra un deterioro del material conservado, posiblemente por defectos de bolsas o problemas en la eliminación de oxígeno en el proceso de conservación del brócoli (Meneses 2002, Der Bedrosian y Kung, 2019, Domingo, 2023). Este evento no se podría atribuir a la inclusión de la proteasa exógena, debido a que la muestra que presenta un olor ácido no presenta daños en su estructura y su inclusión del aditivo fue menor a los 2000 mg/kg de proteasa en material conservado.

Por otro lado, los parámetros fermentativos mostraron que los ensilados con o sin inclusión de una proteasa exógena tuvieron diferentes niveles de pH en su conservación (P = 0,031, entre 4,71 y 5,15 de pH), normales o promedios de un silo bien conservado (entre 4,01 y 5,01 de pH), concordando con sus niveles de temperatura interna constante de conservación de 17 °C (P = 0,435), concentraciones similares de NH₃, que muestra una concentración normal para el mantenimiento fermentativo ideal de ensilados tipo bolsa (Der Bedrosian y Kung, 2019, Domingo, 2023). Parámetros ideales que indica que la fermentación láctica ha sido exitosa, lo que ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos no deseados, como bacterias y hongos, y asegura la conservación adecuada del ensilado.

Tabla 5 Valores medios de las características sensoriales y parámetros fermentativo del ensilado de brócoli con y sin inclusión de una proteasa.

Sensorial ²	Parámetros fermentativos	Flieg
------------------------	--------------------------	-------

Muestra ¹	Color	Olor	Estructura	pH	°C	NH ₃ , % de N	Score ³
						total	
EBR0	3	6,3 a	2,7 a	5,15 a	17 a	11,1 a	37 a
EBR1	3	6,5 a	3,0 a	4,71 b	16 a	11,1 a	54 b
EBR2	3	5,0 c	3,0 a	4,82 b	17 a	10,9 a	50 c
EBR3	3	3,8 d	3,0 a	5,41 a	17 a	11,2 a	26 d
EBR4	3	6,3 a	2,8 a	4,80 b	16 a	10,9 a	50 c
EEM		1,68	0,100	0,054	0,154	0,038	5,64
P valor		0,043	0,573	0,031	0,435	0,184	0,003

¹ EBR0: ensilado de brócoli sin inclusión de un aditivo y EBR1, EBR2, EBR3 y EBR4: ensilado de brócoli con niveles de inclusión una proteasa Poultrygrow 250. ² color: 3: verde, 2: amarillo, 1: marrón; Olor: 6: dulce, 4: ácido y 2: putrefacto; 3: intacto, 2: duro y 1: suave. Flieg Score: valores de calidad del ensilaje entre 100-81: muy buena, 80-61 buena, 60-41 media, 40-21 baja y 20-0 mala. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($P > 0,05$).

La calidad de la conservación de los ensilados de brócoli sin inclusión de un aditivo y los ensilados de brócoli con niveles de inclusión de una proteasa fue diferente ($P = 0,003$), mostrándose una calidad media para los EBR1, EBR2 y EBR y una baja calidad para los EBR0 y EBR3. Estos resultados fueron evidentes, debido al porcentaje de materia seca con el que se inició la conservación del brócoli de 10%. Como valora Kilics (1986) a los ensilados con parámetros de buena calidad cuando estos se conservan con un nivel de 10% de MS, sin embargo, sus recomendaciones se fijan para forrajes. En este estudio y bajo los parámetros de conservación del brócoli, con y sin inclusión de una proteasa exógena, antes mencionados, se pretendió mantener las constantes descritas por Kilics (1986) sobre los forrajes conservados.

7. Conclusiones

- La conservación del brócoli, con o sin la adición de una proteasa, puede afectar los contenidos de nutrientes y componentes estructurales del brócoli en comparación con el estado fresco. Aunque la inclusión de una proteasa no mostró una mejora consistente en la retención de proteína bruta, fibra bruta o extractos libres de nitrógeno, sí se observó un incremento en el contenido de grasa y cenizas tras la conservación.
- En términos de la pared celular, la conservación con y sin proteasa mejoró los contenidos de fibra neutro detergente, fibra ácido detergente y lignina ácido detergente en ciertos silos, sugiriendo que los métodos de conservación pueden influir positivamente en la estabilidad estructural del brócoli.
- La enzima proteasa exógena a una concentración de 1000 mg/kg, no provocó pérdidas significativas en los contenidos de proteína bruta, fibra bruta y cenizas en comparación con las muestras sin proteasa o con una mayor concentración de proteasa.
- La proteasa mostro ser un aditivo apto para la preservación de brócoli hasta los 45 días de almacenamiento, sin empeora el contenido nutritivo del material conservado y acelera los procesos de fermentación provocando un aumento de la degradabilidad de la pared celular liberando proteínas y carbohidratos solubles.

8. Recomendaciones

- Para futuros ensayos o procesos de conservación de vegetales en forma de ensilados, sean estos a un nivel de investigación o reproducidos en la práctica productiva, se recomienda llevar el porcentaje de materia seca a porcentajes sobre el 20% para obtener categorías de calidad superiores a las demostradas en este trabajo.
- En general, la elección del aditivo y la concentración utilizada para la conservación de residuos de brócoli deben ser cuidadosamente evaluadas para optimizar la calidad nutricional y estructural del brócoli conservado.

Referencias

- Acura. (2023). ¿Qué es un silo? Características, usos y precauciones. Obtenido de grupo acura : <https://grupoacura.com/es/blog/que-es-un-silo/>
- Afshar, M., & Naser, M. (2008). Nutritive Value of Some AgroIndustrial By-products for Ruminants.
- agroempresario. (2024). Acopio y almacenaje. Obtenido de <https://agroempresario.com/publicacion/19660/silos-bunker/?cat=382>
- Alvinox . (2023). Alvinox . Obtenido de ¿Qué tipos de silos existen y cuáles son los más adecuados para la industria?: <https://www.alvinox.com/tipos-silos-industria/>
- American Water Chemicals. (2024). Silos de Almacenamiento. Obtenido de <https://www.membranechemicals.com/es/water-treatment/silos-de-almacenamiento/>
- Bala, S., Garg, D., Sridhar, K., & Inbaraj, S. (2023). Transformation of Agro-Waste into Value-Added Bioproducts and Bioactive Compounds: Micro/Nano Formulations and Application in the Agri-Food-Pharma Sector. Bioengineering. doi:10.3390/bioengineering10020152
- Bala, S., Garg, D., Sridhar, K., Inbaraj, B., Singh, R., Kamma, S., . . . Sharma, M. (2023). Transformation of Agro-Waste into Value-Added Bioproducts and Bioactive Compounds: Micro/Nano Formulations and Application in the Agri-Food-Pharma Sector. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9952426/>
- Bartosik , R., Urcola, H., Cardoso, L., Maciel, G., & Busato, P. (2023). Silo-bag system for storage of grains, seeds and by-products: A review and research agenda. Elsevier. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jspr.2022.102061>
- Bonilla, A., Pintag, M., & Medina, G. (2023). Uso potencial de residuos agroindustriales como fuente de compuestos fenólicos con actividad biológica. Scielo. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2023000601322#:~:text=CONCLUSIONES-,Los%20residuos%20agroindustriales%20poseen%20un%20elevado%20potencial%20como%20novedosa%20fuente,antimicrobiano%20y%20la%20actividad%20antiproliferativa.
- Burbano , M. (2023). repositorio universidad del cotopaxi. Obtenido de Respuesta Del Cultivo De Brócoli (Brassica oleracea var. Itálica) A La Aplicación De Tres Láminas De Riego En Las

- Terrazas De Banco En El Campus Salache-UTC, 2023.”: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/10966/1/PC-003034.pdf
- Cantão , L., Rodrigues, J., Caldas, A., Figueiredo, F., Holanda , R., & Nunes de Carvalho, R. (2021). From waste to sustainable industry: How can agro-industrial wastes help in the development of new products? Elsevier. doi:https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.105466
- D'Alessandro , Á., Dibenedetto , R., Skoufos, I., & Martemucci, G. (2023). Uso potencial de paja de trigo, orujo de uva, aguas residuales de almazara y suero de queso en formulaciones mixtas para la producción de ensilaje. *agronomy*. Obtenido de https://www.mdpi.com/2073-4395/13/9/2323
- De Evan, T., Marcos, C., Ranilla, M., & Carro, M. (2020). In Vitro and In Situ Evaluation of Broccoli Wastes as Potential Feed for Ruminants. *Animals*. doi:10.3390/ani10111989
- Demagnet, R. (2019). universidad de la frontera. Obtenido de Tipos de silos : chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://praderasypasturas.com/rolando/01.-Catedras/09.-Conservacion_de_Forrajese/2019/05.-Tipos_de_Silos.pdf
- Díaz, B., Iglesias, A., & Valiño, E. (2014). Evaluación del bioensilaje de brócoli (*Brassica oleracea* L.) y avena (*Avena sativa* L.) como suplemento en vacas lecheras. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://core.ac.uk/download/pdf/481681211.pdf
- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2020). Infostat version 2020. *Centro de transferencias Infostat FCA*. Córdoba, Argentina. Obtenido de Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStathttp://www.infostat.com.ar
- DISMET. (2019). ¿Porque elegir silos horizontales para el almacenamiento de materiales? Obtenido de https://www.dismet.com/porque-elegir-silos-horizontales-para-el-almacenamiento-de-materiales/
- Domingo, R. M. (2023). Efecto de la inclusión de ensilados de planta y subproducto de alcachofa (*cynara scolymus* L.) y subproducto de brócoli (*brassica oleracea* var. *italica*) en la ración

de cabras murciano-granadinas sobre las características de leches fermentadas (Doctoral dissertation, Universidad Miguel Hernández de Elche).

Dunière, L. S.-D.-S. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. Elsevier. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0377840113000862>

Duque, I., & Murillo, A. (2021). Análisis de los canales de comercialización del brócoli en Ecuador. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 33(3), 181-201.

Du, Z., Yang, F., Jiachen, C., Yamasaki, S., Oya, T., Nguluve, D., . . . Cai, Y. (2023). Silage preparation and sustainable livestock production of natural woody plant. *Frontiers*. doi:<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1253178>

Enenebeaku, C., Enenebeaku, U., & Ezejiofor, T. (2018). Evaluation of selected agricultural wastes as viable sources of vitamin supplements in poultry feeds. *World News the natural sciences*.

FAO. (2020). Silage making for smallholders. Food and agriculture organization of the united nations. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.fao.org/3/ca9937en/CA9937EN.pdf>

FAO. (2020). Silage making for smallholders. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/8b5ebb85-8c06-4641-9e0d-d5bf849922ff/content>

Farina, G., Rotta, P., & Marcondes, M. (2021). produção de volúmenes parabovinos leiteiros em el sur de brasil. Viçosa: SCIENZA. doi:10.26626/978-65-5668-033-0C0002.p.19-48

Fernandez, M., del Amo, E., Lucas, S., García, T., & Coca, M. (2022). Liquid fertilizer production from organic waste by conventional and microwave-assisted extraction technologies: Techno-economic and environmental assessment. Elsevier. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721059829>

Finch, Samuel, & Lane. (2002). Conservation of winter feed. En A. S. H.J.S. Finch (Ed.). Woodhead Publishing. doi:<https://doi.org/10.1533/9781855736504.4.448>.

- Ganaderia, M. d. (2022). FLIPHTML5 . Obtenido de boletín situacional cultivo de brócoli : https://fliphtml5.com/ijia/uwcn/Bolet%C3%ADn_Situacional_Br%C3%B3coli_2022/
- Gutierrez , A., & Villacis , K. (2023). Determinación de la producción en diferentes densidades de plantación. universidad tecnica de Ambato , <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/38302>.
- Hao, W., Tian, P., Zheng, M., Wang, H., & Xu, C. (2019). Characteristics of proteolytic microorganisms and their effects on proteolysis in total mixed ration silages of soybean curd residue. *Animal Bioscience*. doi:<https://doi.org/10.5713/ajas.18.0933>
- Hazard, S., Morales, M. S., Butendieck, N., Gómez, P., & Mardones, P. (2001). Evaluación de la mezcla ensilaje de maíz con ensilaje de trébol rosado en diferentes proporciones, en la alimentación invernal de vacas lecheras en la zona sur. *Agricultura Técnica*, 61(3), 306-318.
- Hongliang, Tairu, Zhaochang , & Xintan. (2022). Assessment on the Fermentation Quality and Bacterial Community of Mixed Silage of Faba Bean With Forage Wheat or Oat. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9114351/>
- Horrocks, & Vallentine. (1999). PROCESSING AND STORING SILAGE. En *Harvested Forages*. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-012356255-5/50039-0>.
- IDEAGRO. (2024). Bolsa silopack. Obtenido de <https://www.ideagro.com/bolsa-silo-pack>
- INCOPP. (2004). Incoppsa. Obtenido de <http://www.incoppsa.com.ar/plantas/grunbein.htm>
- Le Gall, J. (2009). El brócoli en Ecuador: la fiebre del oro verde: Cultivos no tradicionales, estrategias campesinas y globalización. *Anuario Americanista Europeo*.
- INEC. (2021). *Programa nacional de estadística 2021-2025*. Obtenido de Instituto nacional de estadística y Censos, Quito - Ecuador : https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Boletin%20Tecnico%20ESPAC%202020.pdf
- M. Dentinho, K. P. (2023). Silages of agro-industrial by-products in lamb diets – Effect on growth performance, carcass, meat quality and in vitro methane emissions. *ELSEVIER*.

- Meneses Mayo, M. (2002). Evaluación nutritiva y fermentativa del ensilado de dos subproductos agroindustriales: brócoli (*brassica oleracea*, l. Var itálica) y alcachofa (*cynara scolymus* l) para su empleo en la alimentación animal (Doctoral dissertation, Universidad de Murcia).
- Molina, A. M. G., Roa, L. B., Alzate, S. R., León, J. G. S. D., & Arango, A. F. B. (2004). Ensilaje como fuente de alimentación para el ganado. *Revista lasallista de investigación*, 1(1), 66-71.
- Monllor , P. (2021). Monl Valorización del subproducto de brócoli (*Brassica oleracea*, var. Italica) y del subproducto y la planta de alcachofa (*Cynara scolymus*) para alimentación de cabras Murciano-Granadinas.
- Monllor, P., Muelas, R., Roca, A., Atzor, A., Díaz, J., Sendra, E., & Romero, G. (2020). Long-Term Feeding of Dairy Goats with Broccoli By-Product and Artichoke Silages: Milk Yield, Quality and Composition. *Animals*. doi:10.3390/ani10091670
- Muck , R., Nadeau, E., McAllister, T., Contreras, F., Santos, M., & Kung , L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. Elsevier. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2017-13839
- Muck, R. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *scielo brazil*. Obtenido de <https://www.scielo.br/j/rbz/a/ynGDVy5rLyTQPPWMjHssmDM/?lang=en>
- Muck, R., Kung , L., & collins, m. (2020). Silage Production. En *Forages: The Science of Grassland Agriculture*, II, 7TH Edition. doi:https://doi.org/10.1002/9781119436669.ch42
- Parray, S., & Mazza, A. (2009). SILO SUBTERRÁNEO. En *Catálogo de Tecnologías para Pequeños Productores Agropecuarios*,. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgiclfndmkaj/https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/138-Silo_subterraneo.pdf
- Prandi, B., Faccini , A., lambertini, f., Bencivenni , M., Jorba, M., Droogenbroek , B., . . . Sforza, S. (2019). Food wastes from agrifood industry as possible sources of proteins: A detailed molecular view on the composition of the nitrogen fraction, amino acid profile and racemisation degree of 39 food waste streams. *Science Direct*. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.166
- Rațu , N., Veleșcu , I., & Stoica, F. (2023). Application of Agri-Food By-Products in the Food Industry. *Agriculture*. doi:https://doi.org/10.3390/agriculture13081559

- Santos Roseira, J., Gomes Pereira, O., Chagas da Silveira, T., & da Silva, V. (2023). Effects of exogenous protease addition on fermentation and nutritive value of rehydrated corn and sorghum grains silages. *Sci Rep*. doi:10.1038/s41598-023-34595-w.
- Seadi, T., & Holm, J. (2004). *Solid Waste: Assessment, Monitoring and Remediation*. Elsevier. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/agricultural-waste>
- Siesquen, L. (2022). Análisis de estudios de residuos sólidos orgánicos y su reutilización a través del proceso de valorización.
- Siesquen, L. (2022). Análisis de estudios de residuos sólidos orgánicos y su reutilización a través del proceso de valorización.
- Trejo , D., García , J., & Gutiérrez, C. (2019). Conversión de residuos a biocombustibles. CIENCIA. Obtenido de chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/70_1/PDF/ResiduosBiocombustibles.pdf
- Vélez , P., & Álava , A. (2021). Análisis de los canales de comercialización del brócoli en Ecuador. RTE. Obtenido de <https://rte.espol.edu.ec/index.php/tecnologica/article/view/857>
- Yafetto , L., Tawia , G., & W, M. (2023). Valorization of agro-industrial wastes into animal feed through microbial fermentation: A review of the global and Ghanaian case. *Heliyon*. Obtenido de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844023020212>
- Zakarya, I., Khalib, S., & Ramzi, N. (2018). Effect of pH, temperature and moisture content during composting of rice straw burning at different temperature with food waste and effective microorganisms. *E3S science*. doi:<https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183402019>

Anexos:

Anexo A. Corte y recolección de brócoli



Anexo B. Planta de Brócoli recién cosechada



Anexo C. Muestras de ubicaciones aleatorias de los barrios de san Joaquín



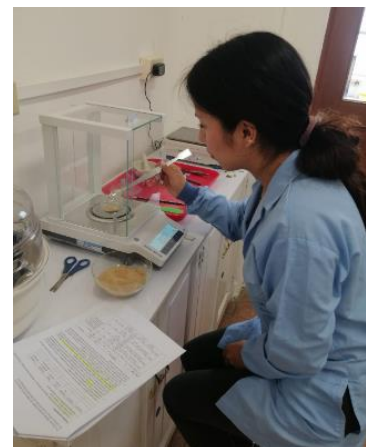
Anexo D. Proceso de picado de la planta de brócoli del tamaño recomendado en la teoría



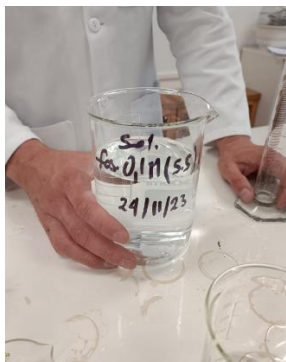
Anexo E. Oreo de partículas picadas



Anexo F. Preparación de la enzima



Anexo G. Preparación de la solución buffer



Anexo H. Pesaje de las cantidades exactas de brócoli a usar



Anexo I. Mezcla del brócoli picado con la enzima y solución buffer



Anexo J. Identificación de las bolsas según el tratamiento.



Anexo K. Empaque de los tratamientos

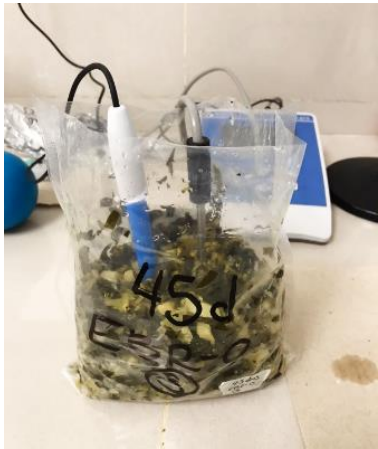


Anexo L. Sellado al vacío de las bolsas



Anexo M. Almacenaje de las bolsas

Anexo N. Revisiones periódicas de las bolsas

	
Anexo O. Pesaje de las bolsas a los 45 días sin abrir 	Anexo P. Apertura de bolsas 
Anexo Q. Observación del color y estructura del ensilaje. 	Anexo R. Toma de temperatura del silo. 
Anexo S. Análisis de características organolépticas	Anexo T. Recolección del líquido de cada uno de los silos.

