
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**ELABORACIÓN DE ENSILADO DE PESCADO VÍA
MICROBIANA, A PARTIR DE LOS RESIDUOS PROVENIENTES
DEL PROCESAMIENTO DE ATÚN Y FILETEADO DE
DIVERSAS ESPECIES DE PESCADO.**

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Córdova B. Josmary D.
Para optar al Título de
Ingeniero Químico

Caracas, Mayo de 2010

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

ELABORACIÓN DE ENSILADO DE PESCADO VÍA MICROBIANA, A PARTIR DE LOS RESIDUOS PROVENIENTES DEL PROCESAMIENTO DE ATÚN Y FILETEADO DE DIVERSAS ESPECIES DE PESCADO.

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Armando Vizcaya

TUTOR INDUSTRIAL: Ing. Ruselquis Guzman

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por la Br. Córdova B. Josmary D.
Para optar al Título de
Ingeniero Químico

Caracas, Mayo de 2010

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por la Br. Josmary D. Córdova B., titulado:

“ELABORACIÓN DE ENSILADO DE PESCADO VÍA MICROBIANA, A PARTIR DE LOS RESIDUOS PROVENIENTES DEL PROCESAMIENTO DE ATÚN Y FILETEADO DE DIVERSAS ESPECIES DE PESCADO.”

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducente al Título de Ingeniero Químico, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por el autor, lo declaran **APROBADO.**



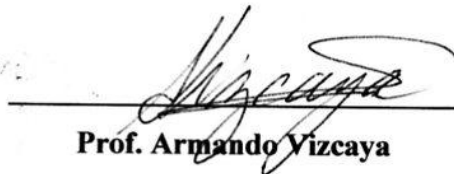
Prof. (a) Amelia Estévez

Jurado



Prof (a). Alejandra Meza

Jurado



Prof. Armando Vizcaya

Tutor Académico

Córdova B. Josmary D.

“ELABORACIÓN DE ENSILADO DE PESCADO VÍA MICROBIANA, A PARTIR DE LOS RESIDUOS PROVENIENTES DEL PROCESAMIENTO DE ATÚN Y FILETEADO DE DIVERSAS ESPECIES DE PESCADO.”

Tutor Académico: Prof. Armando Vizcaya.

Tutor Industrial: Ing. Ruselquis Guzman

**Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química.
2010, n° pag. (106).**

Palabras clave: Ensilaje, residuos animales, atún, proteínas en la nutrición animal, hidrólisis

Resumen: Se implementó la técnica del ensilado microbiológico para la elaboración de un alimento concentrado para animales a partir de los desechos del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado, los ensilados fueron elaborados con 3 tipos de sustratos: E_A: pescados enteros, incluyendo cabezas, vísceras, piel y escamas, E_B: pescados enteros, eviscerados, con cabezas, piel y escamas y E_C: músculo de pescados, como fuente de carbohidratos se empleó la melaza de caña, ácido sórbico como agente antimicótico y yogurt como inóculo, la materia prima al igual que la melaza fueron caracterizados vía físico-química y microbiológica para diagnosticar la calidad de los mismos. El proceso de hidrólisis de las proteínas del pescado se evaluó a través del control de los siguientes parámetros: pH, porcentaje de acidez, nitrógeno no proteico (NNP) y consistencia. En la primera experiencia se elaboraron ensilados no inoculados, se observó una disminución de pH e incremento de la acidez en todos los ensilados siendo el E_A quien alcanzó en menor tiempo la condición ácida óptima del medio demostrando así que el mejor sustrato es el compuesto por pescados enteros. En la segunda experiencia se corroboró que la adición de 1% en peso de inóculo optimiza el proceso reduciendo el tiempo en que E_B y E_C alcanzan la condición óptima del medio. Una vez determinó que el E_A inoculado es el que presenta mejores resultados, se determinó la temperatura óptima de operación elaborando los ensilados a las siguientes temperaturas (°C): 15, 25, 35, 45 y 55, donde se evidenció que a temperaturas superiores a 35°C existe un efecto reductor en la carga bacteriana, disminuyendo por ende la producción de ácido láctico que determina la acidez del medio, de allí que esta temperatura se considera óptima, a esta temperatura se evaluó el efecto de la adición de una enzima proteolítica al medio, que disminuyó el tiempo de hidrólisis a horas. Los ensilados mostraron un contenido de proteína igual a 16,27% y una calidad microbiológica aceptable. Basándose en los resultados obtenidos, se puede señalar los ensilados evaluados muestran una buena estabilidad en el tiempo, además se ajustan a los requerimientos nutricionales y energéticos necesarios para introducirlos como fuente de proteína en la alimentación animal.

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE	v
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
I.1 Planteamiento del Problema	3
I.2 Objetivos	4
I.2.1 Objetivo General.....	4
I.2.2 Objetivos Específicos.	4
I.3 Antecedentes	5
Ensilados Químicos.....	5
Ensilados Biológicos.....	7
Utilización de Desechos de Frutas	8
Ensilado en la Alimentación Animal	9
Uso de Bacterias del Yogurt	12
CAPÍTULO II	13
II.1 Ensilado Microbiano de Pescado.....	13
II.1.1 Parámetros fundamentales del Ensilado Microbiano de Pescado	17
II.1.1.1 Tipo de Pescado y Grado de Frescura	17
II.1.1.2 Relación Pescado/Carbohidrato.....	20
II.1.1.3 Tipo de Microorganismo y de Sustrato	20
II.1.1.4 Componentes Solubles	23
II.1.2 Enzimas Proteolíticas	25

II.1.2.1	Enzimas de las vísceras y del tracto digestivo.....	25
II.1.2.2	Enzimas del tejido muscular.....	26
II.1.2.3.	Enzimas Vegetales añadidas.....	27
II.1.2.4	Enzimas Microbianas	32
II.1.3	Métodos de elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado	32
II.2	Cambios durante la Producción y el Almacenamiento del Ensilado.....	36
II.2.1	Proteínas	36
II.2.1.1	Hidrólisis	37
CAPÍTULO III	39
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	39
III.1	Cuantificar la cantidad de desperdicios generados en el procesamiento del atún y fileteado de diversas especies de pescado.	40
III.2	Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.	40
	Fuente de Carbohidratos	41
	Microorganismo	41
	Ácido Sórbico	41
	Enzimas Exógenas	42
III.3	Establecer las condiciones óptimas de operación para la producción de ensilado de pescado vía microbiana.	42
	Experiencia 1.....	42
	Experiencia 2.....	43
III.4	Evaluar la adición de una enzima proteolítica en la producción de ensilado de pescado vía microbiana.	44

Experiencia 3.....	45
III.5 Realizar un control de parámetros físico-químico y fermentativo involucrado en la obtención del ensilado vía microbiana	46
III.6 Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos el producto final con el fin de determinar la calidad del mismo.....	47
III.7 Determinar la temperatura óptima para el almacenamiento del producto terminado.....	47
CAPÍTULO IV	48
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
IV.1 Cuantificar la cantidad de desperdicios generados en el procesamiento del atún y fileteado de diversas especies de pescado.....	48
IV.2 Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.....	50
IV.3 Establecer las condiciones óptimas de operación para la producción de ensilado de pescado vía microbiana.....	52
Experiencia 1.....	53
Experiencia 2.....	57
Temperatura de Operación.....	63
IV.4 Evaluar la adición de una enzima proteolítica en la producción de ensilado de pescado vía microbiana.....	70
Ensayos Preliminares.-	70
Actividad Proteolítica de las preparaciones comerciales de bromelina y de papaína sobre las proteínas del pescado.....	72
Experiencia 3.....	79

IV.5 Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos el producto final con el fin de determinar la calidad del mismo.....	81
IV.6 Determinar la temperatura óptima para el almacenamiento del producto terminado.....	84
CAPÍTULO V	89
CONCLUSIONES	89
CAPÍTULO VI.....	90
RECOMENDACIONES	90
BIBLIOGRAFÍA	91
ANEXO 1	95
Caracterización Físicoquímica	95
Determinación de Humedad: Norma COVENIN 1156-79	95
Determinación de Cenizas: Norma COVENIN 1155-79	95
Determinación de pH (acidez iónica): Norma COVENIN 1315-79	96
Determinación de Consistencia.....	96
Determinación de Nitrógeno y Proteínas: Norma COVENIN 1195-80.....	96
Determinación de Grasa Cruda: Norma COVENIN 1162-79	97
Acidez Total Titulable: Norma N° 10.034 A.O.A.C., 1990.	97
Caracterización Microbiológica	98
Preparación de la Muestra y diluciones: Norma COVENIN 1126-77	98
Recuento de Aerobios Mesófilos: Norma COVENIN 902-78.....	98
Recuento de E. Coli en placas Petrifilm: Norma COVENIN 3276-97	98
Recuento de Enterobacterias en Placas Petrifilm.....	99
Recuento de Mohos y levaduras: Norma COVENIN 1337-90.....	99
Recuento de Salmonella: Norma COVENIN 1291-88	99

ANEXO 2.....	100
Procedimiento experimental seguido para la elaboración de los ensilados	100
ANEXO 3.....	103
Determinación de la actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de bromelia y papaína.	103
Preparación de la muestra	103
Preparación de las enzimas	104
Medición de la actividad enzimática.....	106
Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la bromelina	106
ANEXO 4.....	108
Cálculos intermedios.....	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Composición química del atún entero.	19
Tabla N° 2 Composición proximal de la parte no comestible del atún.....	19
Tabla N° 3 Composición química de la melaza.	24
Tabla N° 4 Residuos generados en el primer y segundo turno de producción.	48
Tabla N° 5 Composición proximal, pH y caracterización microbiológica del pescado utilizado en la elaboración de los ensilados.	50
Tabla N° 6 Análisis físico, químico y microbiológico de la melaza utilizada en la elaboración de ensilado de pescado.	52
Tabla N° 7 Valores de nitrógeno no proteico (NNP) en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).	56
Tabla N° 8 Contaje de aerobios mesófilos en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).	60
Tabla N° 9 Valores de nitrógeno no proteico (NNP) en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).	61
Tabla N° 10 Cambios en el contaje de aerobios mesófilos en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.	66
Tabla N° 11 Cambios en la características organolépticas de los ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.	68
Tabla N° 12 Valores de nitrógeno no proteico en ensilados elaborados con mezclas de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo y concentraciones variables de bromelina.	79
Tabla N° 13 Análisis físico y químico del ensilado de pescado al inicio y al final del período de almacenamiento a 30°C.	82

Tabla N° 14 Cambios en los valores de contaje de bacterias ácido-lácticas y NNP, durante el almacenamiento a 30 °C.....	87
Tabla N° 15 Cambios en los valores de contaje de bacterias ácido-lácticas y NNP, durante el almacenamiento a 45 °C.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Flujoograma de la metodología empleada	39
Figura N° 2 Valores de pH en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).....	53
Figura N° 3 Producción de ácido láctico en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).....	54
Figura N° 4 Valores de consistencia en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).....	55
Figura N° 5 Valores de pH en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).....	58
Figura N° 6 Producción de ácido láctico en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).....	59
Figura N° 7 Valores de consistencia en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).....	62
Figura N° 8 Valores de pH en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.....	64
Figura N° 9 Producción de ácido láctico en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.....	65
Figura N° 10 Valores de consistencia en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.....	67

Figura N° 11 Actividad de preparaciones comerciales de papaína y bromelina sobre la caseína a pH 8.0 y pH 7.2 respectivamente.	71
Figura N° 12 Actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de papaína y bromelina sobre las proteínas de la carne del pescado a pH 8.0 y 7.2 respectivamente.	72
Figura N° 13 Actividad proteolítica de una preparación comercial de papaína sobre las proteínas de la carne de pescado a tres valores de pH.....	75
Figura N° 14 Actividad proteolítica de una preparación comercial de bromelina sobre las proteínas de la carne de pescado a tres valores de pH.....	76
Figura N° 15 Efecto del tiempo de inoculación sobre la actividad proteolítica de la bromelina a pH 5.5.....	78
Figura N° 16 Valores de consistencia en ensilados elaborados con mezclas de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo y concentraciones variables de bromelina.	80
Figura N° 17 Valores de pH en los ensilados almacenados a 45 °C y 30°C.	85
Figura N° 18 Producción de ácido láctico en los ensilados almacenados a 45 °C y 30°C.	86
Figura N° 19 Valores de consistencia en los ensilados almacenados a 45 °C y 30°C.	88
Figura N° 20 Esquema de Elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado.....	101
Figura N° 21 Esquema de Elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado con adición de Enzima.....	102
Figura N° 22 Preparación de la muestra para la determinación de la actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de papaína y bromelina.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura N° 23 Preparación de papaína para determinar su actividad proteolítica.	¡Error! Marcador no definido.
Figura N° 24 Preparación de bromelina para determinar su actividad proteolítica.	¡Error! Marcador no definido.
Figura N° 25 Medición de actividad proteolítica de la enzima.....	¡Error! Marcador no definido.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los alimentos para animales han sido formulados considerando las harinas de pescado. Sin embargo, existen razones económicas y operativas que han incentivado la producción del ensilado de pescado en muchos países. Varios trabajos han tratado las ventajas y desventajas económicas de ambas alternativas (Tatterson and Windsor, 1973; Windsor y Barlow, 1984).

En el ensilado microbiano o biológico se le añade a la materia prima triturada una fuente de carbohidratos y un microorganismo, capaz de utilizar el substrato y producir ácido láctico. Se han estudiado diferentes fuentes de carbohidratos tales como harinas de maíz, harina de avena, cebada malteada, arroz, yuca, azúcar, melaza, y distintos organismos productores de ácido láctico (inóculo), entre otros, *Lactobacillus plantarum*, *Hansenula montevideo*, bacterias lácticas del yogurt y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como repollo, papaya, banana, piña, camote, yuca, etc. (Bertullo, 1994).

En la bibliografía se pueden encontrar diferentes alternativas tecnológicas para la producción de ensilados, que se presentan como resumen de la información analizada. La elaboración de ensilado biológico puede llevarse a cabo tanto a nivel artesanal (barriles de 50 kg) como en escala industrial (una tonelada por día o más) (Poulter y Disney, 1982). No se han encontrado límites técnicos en el tamaño de la planta. El proceso puede ser manual, discontinuo o totalmente automatizado, y las etapas que involucran son: molienda, homogenización, envasado y almacenamiento.

Las instalaciones de las etapas que se utilizan para la elaboración de ensilado dependen del volumen de producción. Los equipos empleados para la etapa de trituración o molienda pueden ser una adaptación de equipos disponibles localmente

como molino picador de coco, picadora de carnes convencional a tornillo con placas perforadas, molino de martillo desintegrador, bomba trituradora (Mutrator). Este último equipo sirve como mezclador y es usado cuando se procesan pescados pequeños o sólo vísceras.

El mezclado u homogenización del pescado molido con el inóculo y la fuente de carbohidratos puede ser realizado en un tanque de concreto en caso del ensilado biológico, también es necesario que la mezcla se agite regularmente para asegurar uniformidad hasta su completa homogenización. El tamaño y el número de tanques dependen de la cantidad y tipo de la materia prima disponible.

De allí la necesidad de evaluar el proceso de elaboración de ensilado vía microbiana, a fin de determinar las condiciones óptimas de operación para luego realizar las especificaciones de las etapas involucradas en el mismo.

I.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace algunos años se vienen realizando alrededor de todo el mundo, estudios en torno al aprovechamiento de residuos de pescado como fuentes de proteína para uso en raciones animales. Aquellos productos en que la proteína aparece más concentrada que en el pescado original son conocidos como concentrados de proteína de pescado, y en años recientes han tenido éxito los métodos de preparación de este tipo de concentrados a escala comercial. El término abarca una gama de productos que van desde la harina de pescado hasta un hidrolizado, es decir, un producto semi-líquido o pastoso como el ensilado de pescado.

Para la elaboración del ensilado de pescado es necesaria la hidrólisis del mismo, la cual se lleva a cabo de dos formas básicas, una es a través de la adición de ácidos minerales u orgánicos (ensilado químico), tales como el fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico, etc. y la otra es con la utilización de microorganismos productores de ácido láctico (ensilado biológico), utilizando una fuente de carbohidratos; la presencia de ácido crea el ambiente adecuado para que actúen las enzimas presentes naturalmente en las vísceras. El empleo de un ácido orgánico o un ácido mineral, detiene también la multiplicación de las bacterias que provocan la alteración del producto y ayuda a la descomposición del tejido óseo.

La elaboración de ensilados biológicos utilizando residuos de pescado exige una inversión baja, de allí que la mayor importancia de la producción de ensilados está en la formulación de raciones de bajo costo ya que su producción es más barata que la de la harina de pescado y sin problemas de olores durante su elaboración y también posee un alto valor nutricional.

Actualmente, Alimentos Polar Comercial Planta Mariguitar produce harina de pescado a partir de los residuos generados por el procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado, la cual en comparación con la producción de ensilado de pescado presenta varias desventajas dentro de las cuales se encuentran mayores costos asociados a la producción y desde el punto de vista nutricional la

harina de pescado se lleva a cabo a elevadas temperaturas (120-150) °C lo que tiene un efecto perjudicial sobre la calidad de la misma, ya que el calor produce una importante disminución del valor biológico de las proteínas (Villela *et al*, 1992).

De allí la necesidad de estudiar y evaluar el empleo de estos residuos en la producción de otro producto concentrado como el ensilado de pescado.

I.2 OBJETIVOS

A continuación se presentan los objetivos generales y específicos que serán desarrollados a lo largo del trabajo.

I.2.1 Objetivo General

Elaborar ensilado de pescado vía microbiana, a partir de los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.

I.2.2 Objetivos Específicos.

- Cuantificar la cantidad de desperdicios generados en el procesamiento del atún y fileteado de diversas especies de pescado.
- Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.
- Establecer las condiciones óptimas de operación para la producción de ensilado de pescado vía microbiana.
- Evaluar la adición de una enzima proteolítica en la producción de ensilado de pescado vía microbiana.
- Realizar un control de parámetros físico-químicos y fermentativos involucrados en la obtención del ensilado vía microbiana.
- Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos el producto final con el fin de determinar la calidad del mismo.
- Determinar la temperatura óptima para el almacenamiento del producto terminado.

I.3 ANTECEDENTES

Ensilados Químicos

Las primeras experiencias en elaboración de ensilados de pescado en Venezuela se realizaron en 1984 en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Central de Venezuela, trabajando con ensilados de pescado químicos. El objetivo de estas experiencias fue aprovechar la abundante fauna acompañante del camarón, capturado con redes de arrastre en la zona oriental del país (Córdova y Bello, 1990).

Este ensilado se elaboró a partir de una mezcla de 27 especies de pescados enteros, frescos y molidos, a la cual se añadieron ácidos sulfúrico y fórmico al 3,5 % en peso, en una relación 1:2, 1:3, y 1:4. El material fue colocado en recipientes plásticos cerrados a temperatura ambiente por 15 días como mínimo para completar la hidrólisis. El producto obtenido fue de consistencia líquida pastosa, de color marrón y con fuerte olor a pescado y ácido. Se encontró la necesidad de realizar una molienda muy fina para garantizar el contacto del pescado con el ácido, el control sobre los organismos putrefactores y el descenso del pH a un nivel adecuado para la acción de las enzimas proteolíticas. Una agitación frecuente fue requerida para facilitar el proceso anterior.

Como índices de evaluación del proceso se realizaron análisis de humedad, cenizas, proteínas, grasa, pH, líquido exudado, consistencia, nitrógeno básico volátil, nitrógeno soluble, trimetilamina, ácido tiobarbitúrico y recuento de microorganismos. El ensilado obtenido presentó la siguiente composición proximal: 77.2 % de humedad, 16.7 % de proteínas, 1.3 % de grasa y 4.8 % de cenizas. El bajo contenido de grasa se debió principalmente a que el pescado utilizado no había llegado a su madurez fisiológica. Este producto una vez secado presentó niveles de proteína comparables a la harina de pescado.

El producto fue ensayado con pollos en crecimiento con dietas de 6% de harina o ensilado seco de pescado. Se midió la ganancia de peso y el consumo de alimento, y se calculó la eficiencia de conversión, en un ensayo de cuatro semanas. Los resultados indicaron un comportamiento similar de los pollos en ambos tratamientos. Los resultados del ensayo y de los análisis proximales, de perfil de aminoácidos y de minerales indicaron la factibilidad de utilizar el ensilado de pescado en sustitución de la harina de pescado tradicional en pollos de engorde.

Posteriormente, Rodríguez *et al* (1990a) realizan ensayos con ensilado elaborado con una mezcla de 11 especies de pescado fresco, fauna acompañante del camarón de la zona central del país. Se utilizó el 3,5% de una mezcla con 20% ácido sulfúrico diluido (1:3) y 80% ácido fórmico. Después de 17 días, los índices físicos, químicos y microbiológicos del producto indicaron que el proceso de ensilado fue adecuado y factible, obteniéndose un producto estable y de buena calidad. La composición del ensilado fue: 75.5% de humedad, 17.4% de proteínas; 2.2% de grasa y 4,7% de cenizas.

Adicionalmente con este ensilado se realizaron ensayos por 21 días en ratas Sprague Dawley. Los tratamientos fueron dietas con caseína, con ensilado de pescado, con harina de pescado y sin proteína. Se determinó la ganancia de peso corporal de los animales, el consumo de alimento, se calculó la ingestión de proteína individual y se determinaron los valores de la relación de eficiencia de proteína (PER), la retención neta de proteína (NPR) y de digestibilidad de la proteína.

El mayor consumo de alimento fue en las ratas con harina de pescado y el menor con ensilado. Las ganancias de peso reflejaron el consumo. Los resultados entre los tratamientos con harina de pescado y con caseína, no fueron estadísticamente significativos, mientras que si lo fueron con el ensilado de pescado. En los valores del PER no se observaron diferencias estadísticamente significativas. La NPR fue mayor en los animales con harina de pescado. La digestibilidad aparente de la proteína fue similar en la caseína y en el ensilado, y superior al de la harina de pescado.

En virtud de estos resultados, Rodríguez *et al* (1990b), evaluaron este ensilado en pollos de engorde. Se realizó un ensayo de cinco semanas con 120 pollos (Cobb x Cobb), que se asignaron al azar en grupos de 10 animales cada uno con 4 réplicas por tratamiento. Los tratamientos fueron tres dietas con harina de pescado al 5%, y con ensilado de pescado al 2,5% y 5%. Se midieron el consumo de alimento y el incremento de peso corporal, y se calculó el índice de conversión.

El consumo y el incremento de peso de los pollos alimentados con la dieta que contenía 5% de ensilado fueron superiores significativamente a los otros dos tratamientos, durante las tres primeras semanas, pero similares a partir de la cuarta semana. El índice de conversión fue comparable entre tratamientos. Se sugirió la utilización de 5% de ensilado.

Se realizaron también pruebas sensoriales con el fin de determinar las diferencias entre los pollos alimentados con ensilado en comparación con los de harina de pescado y con los del comercio local. No existieron diferencias entre los tratamientos evaluados, indicando que la calidad de los pollos alimentados con ensilado de pescado es aceptable y satisfactoria.

Ensilados Biológicos

Para elaborar este ensilado se han ensayado diferentes sustratos y microorganismos. Entre los microorganismos se utilizaron el *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus*, *Candida lipolítica* entre otros, y como fuente de carbohidratos se utilizaron harinas de maíz, yuca, arroz y avena; almidón de maíz y melaza. A los compuestos amiláceos se les agregó malta como agente amilolítico.

Se realizaron pruebas para establecer las proporciones mínimas en cuanto a las fuentes de carbohidratos como del inóculo microbiano necesario para la producción de un ensilado estable y económico. El progreso, la eficiencia y la estabilidad del proceso ha sido evaluado mediante una variedad de ensayos físicos, químicos y

microbiológicos como: acidez, pH, consistencia, nitrógeno no-proteico, líquido exudado, humedad, grasa, proteína, cenizas, recuento de microorganismos aerobios mesófilos, mohos, levaduras, número más probable de coliformes totales, coliformes fecales, detección de *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. De todas estas posibilidades quedó establecido el *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 y la melaza como los agentes más eficientes y recomendables.

Después de los diversos ensayos el proceso quedó establecido de la manera siguiente:

- Selección de la materia prima: pescados enteros o eviscerados; filetes; o residuos como vísceras, espinazos, piel escamas, cabezas.
- Lavado y molienda muy fina.
- Adición de la melaza al 15% en peso; de inóculo de *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014 al 5% en peso; y de ácido sórbico al 0,25% en peso, como agente para evitar la formación de hongos en la superficie de la mezcla.
- Envase en contenedores plásticos cerrados para obtener condiciones anaeróbicas y almacenamiento.

Este proceso ha sido utilizado en diferentes trabajos de investigación con resultados satisfactorios, con la reducción del proceso a la mitad del tiempo alcanzado en el ensilado con ácidos (Ottati y Bello, 1990 a, b; Ottati *et al*, 1990; Guevara *et al*, 1991; Martínez *et al*, 1991).

Utilización de Desechos de Frutas

Reyes *et al* (1991) ensayaron la adición de desechos de frutas como una vía para acelerar el proceso de hidrólisis del ensilado. Después de probar con desechos de naranja, piña, banana, y papaya, encuentran que la piña y papaya tienen un efecto positivo en la velocidad del proceso, por efecto de su contenido de las enzimas proteolíticas bromelina y papaína respectivamente. Se determinó que la banana actúa

como una fuente más de carbohidratos y los cítricos no tienen mayor influencia en la velocidad del proceso.

Se estudió como influye el grado de maduración de las frutas, observándose que la piña puede usarse madura y fundamentalmente su jugo, mientras que una mayor concentración de enzimas se encuentran en la corteza verde de la papaya. Evaluando la proporción correcta de estos desechos de frutas, se encontró que una concentración de 10% a 15% en peso es suficiente y adecuada para acelerar el tiempo del proceso de hidrólisis a la mitad sin afectar los demás parámetros. Además estos autores encontraron que la temperatura óptima del proceso está entre 35 y 45 °C., temperatura ésta que favorece la actividad enzimática sin afectar el crecimiento microbiano.

En este mismo sentido Bello *et al* (1993b), añadiendo desechos de piña y papaya, trabajando a 35 °C., lograron acelerar el proceso de hidrólisis a 24 horas, se estudió la conveniencia de utilizar el pescado entero para la elaboración del ensilado, por la presencia de vísceras donde se encuentra una mayor cantidad de enzimas que contribuyen favorablemente a la hidrólisis del pescado. Sin embargo en estudios previos de Bello *et al* (1993a) trabajando con pescado eviscerado, como una vía de reducir la carga microbiana inicial del ensilado, después de evaluar una serie de microorganismos (aerobios mesófilos, psicrófilos, esporas de aerobios y anaerobios, pseudomonas, enterobacterias, coliformes fecales y totales, mohos y levaduras, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, y *Clostridium perfringens*) encontraron que es posible reducir los organismos patógenos por la acidez y reducido pH del medio y por las sustancias antibacterianas producidas por las bacterias ácido-lácticas, generándose ensilados de adecuada calidad microbiológica.

Ensilado en la Alimentación Animal

Los estudios de los ensilados biológicos en la alimentación animal en Venezuela, han sido realizados en cerdos (Ottati y Bello, 1990 a, b), pollos (Guevara *et al*, 1991) y rumiantes (Viète y Bello, 1990).

En el caso de los cerdos, se realizaron estudios en las etapas de crecimiento y engorde. Se iniciaron los estudios con animales jóvenes cruzados Landrace x York de 30 Kg. de peso, a los cuales se les suministró cuatro dietas, dos de ellas con ensilado de pescado al 2,5% y 5,0 % de materia seca de la dieta final; una dieta sin pescado (control) con harina de soya como fuente protéica; y una dieta comercial para cerdos en esta etapa. Los 16 animales se dividieron en cuatro grupos al azar de dos machos y dos hembras. Se evaluó la aceptación y el efecto sobre el rendimiento de los animales sometidos a los 4 tratamientos diferentes constituidos por raciones isoprotéicas e isoenergéticas. Se registraron ganancia de peso, consumo de alimento, aceptación del producto, síntomas adversos y mortalidad.

Para la etapa de engorde igualmente se emplearon cuatro dietas: Control (sin pescado), alimento comercial, y dos niveles de ensilado: 2,5% y 5,0%, utilizando los mismos animales, iniciándose el ensayo con un peso promedio de 60 Kg, hasta alcanzar 90 Kg. de peso final. Similarmente se registró el aumento de peso y el consumo de alimento para determinar el índice de conversión. Adicionalmente se midió el espesor de la grasa dorsal en los animales en pie.

Los resultados de este estudio indican que en los cerdos en la etapa de crecimiento la mejor respuesta biológica se obtiene con la dieta con 5% de ensilado de pescado, mientras que en los cerdos en la etapa de engorde, la mejor respuesta fue con las dietas comerciales y control. Adicionalmente los autores indican que la inclusión de ensilado en la dieta reduce el tiempo requerido por los cerdos en alcanzar el peso comercial, lo cual representa una ventaja en el costo de manutención de los animales.

Seguidamente Ottati y Bello (1990b) evaluando la calidad y el rendimiento de los animales previamente estudiados y luego sacrificados concluyeron que: las mediciones de peso, longitud y espesor de la grasa dorsal, realizadas a las canales, demostraron adecuadas características para los tratamientos: control y 5% de inclusión de ensilado de pescado.

Igualmente concluyeron que la incorporación de ensilado de pescado en la dieta no causó lesiones u otro tipo de problema de índole fisiológico en los animales experimentales. Además notaron que la carne del pernil proveniente de los cerdos alimentados con dietas que incluyeron 5% de ensilado de pescado presentó una mejor composición nutricional. Las pruebas sensoriales realizadas con estos pernils revelaron gran aceptación de la carne.

En cuanto a los estudios realizados en pollos de engorde por Guevara *et al* (1991) se trabajó con 128 pollos del cruce Cobb x Cobb, de un día de nacidos, en un ensayo durante seis semanas. Hubo cuatro tratamientos (dietas con 2.5% y 5% de ensilado de pescado, harina de pescado 5% y control sin pescado), formándose cuatro grupos de ocho animales por tratamiento. Se evaluó el incremento de peso en cada pollo y el consumo de alimentos, para obtener el índice de conversión. Los resultados obtenidos indicaron que no existen diferencias significativas entre los incrementos de peso desarrollado por las aves alimentadas con los diferentes tratamientos, sin embargo se observó que el mejor índice de conversión lo presentó la dieta con 5% de ensilado de pescado.

Al concluir el ensayo se hizo la autopsia de los pollos para evaluar las vísceras, donde no se observaron lesiones en los órganos estudiados. Finalmente se realizó una prueba sensorial en la carne de los pollos alimentados con los dos niveles de los ensilados de pescado y se compararon con pollos adquiridos en el comercio local. Los resultados de esta prueba no mostraron diferencias.

Los estudios realizados con 30 becerros durante 90 días, alimentados con una dieta complementaria de 2 Kg. diarios, a base de harina de soya, harina de maíz, sal y minerales suplementada con ensilado biológico de pescado (0, 100, 200 y 300 g como materia seca por día), indicaron un incremento en peso vivo mayor en los animales suplementados con 100 g de ensilado por día. A pesar de estos resultados se hace necesario ampliar los estudios en rumiantes (Ottati, M. y Bello, R. 1990b).

Uso de Bacterias del Yogurt

Últimamente se han desarrollado nuevos ensilados biológicos de pescado utilizando las bacterias ácido-lácticas del yogurt, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (Aguilera, 1993). La ventaja de estos estudios es que han permitido incorporar microorganismos de más fácil obtención, utilización y manejo.

CAPÍTULO II

REVISION BIBLIOGRÁFICA

II.1 ENSILADO MICROBIANO DE PESCADO

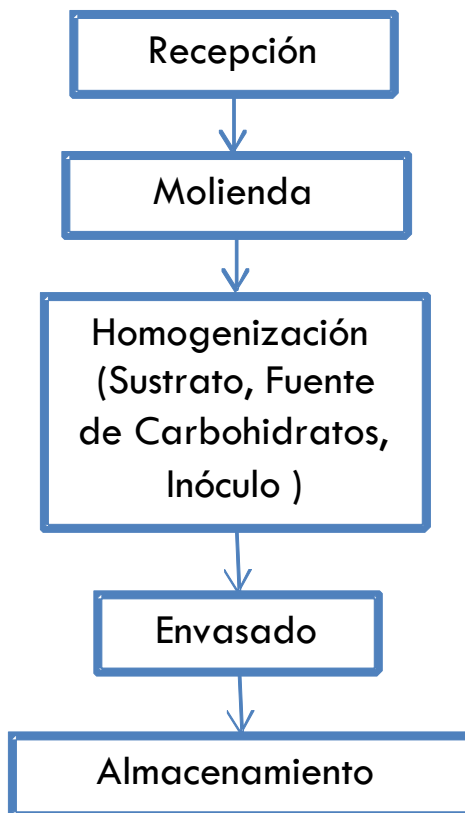
La fermentación es uno de los métodos más antiguos e importantes que se conoce para la elaboración de alimentos. Este proceso involucra transformaciones químicas complejas de sustancias orgánicas mediante la acción catalítica de enzimas propias del alimento o producidas por diversos microorganismos (El Mehdi Hassan, 1980).

El ensilado microbiano es el producto final de un proceso de fermentación controlada, en el cual los carbohidratos añadidos a pescados enteros o restos de ellos, son fermentados por bacterias ácido-lácticas (Van Wyk y Heydenrych, 1985).

El proceso de elaboración del ensilado microbiano de pescado es esencialmente el mismo que el empleado en el ensilado de vegetales, en los cuales el pH se reduce en condiciones anaerobias o aerobias facultativas por la acción de microorganismos homofermentativos o heterofermentativos productores de ácido láctico que se multiplican en un sustrato hidrocarbonatado (Mackie, 1971).

La producción de ensilado de pescado por fermentación biológica, en primer lugar reduce los costos de producción (ya que evita la utilización de ácidos orgánicos), utiliza ciertos subproductos de la agricultura, y además evita que elevadas cantidades de pescado sean descartadas al mar sin ningún tipo de utilización.

En la siguiente figura, se detalla las etapas involucradas en la elaboración de ensilado microbiano de pescado:



En la etapa de recepción se determina con que tipo de materia prima se trabajará, una vez seleccionada ésta, pasará a una etapa de molienda donde esta materia prima será triturada y posteriormente en la etapa de homogenización se le adicionará una fuente de carbono y un microorganismo, capaz de utilizar el sustrato y producir ácido láctico. Se han estudiado diferentes fuentes de carbono tales como harinas de maíz, harina de avena, cebada malteada, arroz, yuca, azúcar y melaza, también distintos organismos productores de ácido láctico, entre otros, *Lactobacillus plantarum*, *Hansenula montevideo*, bacterias lácticas del yogurt y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como repollo, papaya, banana, piña, camote, yuca, etc. (Bello *et al*, 1992; Bertullo, 1994, Areche *et al*, 1992; Lessi *et al*, 1992).

Después de la preparación del ensilado, continúa una etapa de extracción de aceite, que no es necesaria si la materia prima está compuesta de pescado magro, con un contenido en aceite menor del 2% en peso húmedo. La extracción de aceite para pequeña escala sería satisfactoria con una autosedimentación y decantación manual del aceite que flota.

El pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento del ensilado biológico de pescado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier cambio que pueda afectar el producto. Adicionalmente el pH se puede medir muy fácil y rápidamente, inclusive fuera del establecimiento de producción.

Paralelamente a la disminución del pH se observa el incremento rápido en los valores de ácido láctico, el cual se sigue produciendo lentamente por 60 días aproximadamente, hasta mantenerse estable. Esto se debe a un mecanismo de auto control, estando en disponibilidad de continuar produciéndose ácido cuando el pH aumente por incremento de compuestos nitrogenados, producto del crecimiento o desarrollo de organismos distintos a los ácido-lácticos.

En otras palabras existe un sistema de auto control, cuando se generan bases volátiles o compuestos nitrogenados que incrementen el pH, se inicia la producción de ácido por parte de los microorganismos, hasta que la cantidad de ácido en el medio sea suficiente para reducir el pH a niveles cercanos a 4, y detener o controlar el crecimiento de las bacterias y por ende la producción de ácido.

Por esto es importante que la cantidad de melaza añadida sea suficiente como para mantener un pequeño reservorio que le permita a las bacterias lácticas producir suficiente ácido en el momento que sea necesario. Este fenómeno puede verse en los resultados de los contajes de microorganismos mesófilos, los cuales incrementan en el momento en que el pH aumenta y luego disminuyen cuando la cantidad de ácido producida es suficiente para reducir nuevamente el pH a su valor cercano a 4 y auto

inhibir el crecimiento microbiano. Ésta tendencia de los microorganismos a incrementar y luego a disminuir en el tiempo fue observada por Van Wik y Heyderich (1985).

Lógicamente la producción de ácido por los microorganismos conduce a la caída del pH. De allí la importancia que tiene la medida del pH, que proporciona una noción de la producción de ácido y también de la actividad de los microorganismos ácido-lácticos, la estabilidad y la calidad del ensilado.

En cuanto a la otra fase o fenómeno de hidrólisis del ensilado, puede medirse o evaluarse a través del nitrógeno no proteico, el líquido exudado o la consistencia. Estas determinaciones muestran un aumento de la hidrólisis protéica progresiva y rápidamente al inicio del proceso, haciéndose más lenta posteriormente hasta los 60 días.

Aunque ambos fenómenos parecieran estar separados o ser independientes, presentan una relación estrecha. A medida que la hidrólisis protéica progresa, se producen compuestos nitrogenados, como péptidos, aminoácidos, aminas, amonio y otros compuestos de bajo peso molecular, los cuales perturban la capacidad amortiguadora del producto, incrementándose los valores de pH, lo cual conduce a que las bacterias ácido-lácticas comiencen a producir ácido y reducir nuevamente el pH a su valor inicial (Lindgren y Pleaje, 1983).

La frescura inicial del pescado juega un importante rol en la velocidad de reducción del pH inicial. Esto se debe a que se establece un mecanismo de competencia entre las bacterias lácticas y los microorganismos descomponedores. A mayor carga microbiana inicial de organismos que participan en el deterioro del pescado fresco, mayor será la cantidad de bacterias lácticas que se deben inocular para asegurar un adecuado proceso. Igualmente cuando se utilizan las vísceras del pescado en la elaboración del ensilado, se está favoreciendo el fenómeno de hidrólisis, por la presencia de mayor cantidad de enzimas contenidas en las vísceras, pero

paralelamente se esta añadiendo una fuerte carga de microorganismos que es necesario inhibir rápidamente. En consecuencia es recomendable la utilización de pescados frescos y con vísceras para favorecer la velocidad del proceso de ensilado.

II.1.1 Parámetros fundamentales del Ensilado Microbiano de Pescado

El proceso de elaboración del ensilado requiere que las enzimas presentes en las vísceras sean esparcidas a través de la masa de pescado, lo cual se logra por la molienda del pescado entero o mezclado (Tatterson y Windsor, 1974). Se utiliza una fuente de carbohidratos fermentables que son empleados por las bacterias lácticas en la producción de ácido. Estos microorganismos pueden estar presentes naturalmente en la materia prima o en otros casos se requiere de cultivos iniciadores puros (Kompang et. al., 1980). El ácido producido favorece la acción de las enzimas e inhibe al desarrollo de bacterias putrefactivas o patógenas. El producto es almacenado entre 20°C y 30°C para que se efectúe la fermentación, durante la cual se observa un cambio rápido en su composición bacteriológica con dominio de las bacterias ácido lácticas e inhibición de la flora competitiva de la materia prima (Lindgren y Pleje, 1983).

La hidrólisis observada durante el almacenamiento del ensilado es debida principalmente a las enzimas proteolíticas de las vísceras del pescado. El grado de hidrólisis se puede determinar físicamente a través de la consistencia, ya que a medida que las proteínas del pescado se hidrolizan, incrementa su contenido en nitrógeno soluble, lo cual afecta su consistencia.

II.1.1.1 Tipo de Pescado y Grado de Frescura

Hay diversidad de criterios en cuanto a cómo afecta el porcentaje de grasa del pescado la hidrólisis del ensilado, en este sentido, (Raa y Gildberg, 1976), señalan que la solubilización protéica puede reducirse por la presencia de lípidos. También

los lípidos reducen la velocidad de autólisis, posiblemente porque impiden la difusión enzimática, especialmente a temperaturas inferiores a su punto de fusión (Raa y Gildberg, 1982). Por otro lado, (Windsor y Barlow, 1984), señalan que los pescados grasos recién capturados se hidrolizan más rápidamente que los magros y no muy frescos.

Pattagool et al., 1980, evaluaron los cambios producidos durante el almacenamiento de ensilado de pescado elaborado con 30% en peso de melaza, utilizando para ello materia prima fresca, de calidad media y deteriorada. Los tres tipos de ensilados fueron almacenados por un mes, durante el cual se realizaron determinaciones de pH, acidez, nitrógeno no proteico, trimetilamina y contajes bacterianos. Se encontró incremento en la acidez y por consiguiente disminución progresiva en los valores de pH de los tres ensilados. Es de hacer notar, que el pH del ensilado proveniente del pescado deteriorado bajó lentamente hasta alcanzar el valor de 5,5, donde se estancó el descenso, deteriorándose luego, debido a que bajo esta condición no se inhibe la acción de bacterias putrefactivas. También se reporta incremento en las bases volátiles totales y trimetilamina, siendo estos valores mayores en el ensilado obtenido a partir del pescado deteriorado. Este trabajo precisa que puede obtenerse ensilados de pescado a partir de materia prima con diferentes grados de deterioro.

Van Wyk y Heydenrych, 1985, prepararon varios ensilados microbianos de pescado, donde evaluaron la influencia de la calidad del pescado sobre la estabilidad de los mismos. Se encontró que para evitar que un ensilado preparado a partir de pescado de baja calidad se deteriore durante el almacenamiento, se requiere de bacterias lácticas buenas productoras de ácido en tal medio y que se encuentren en fase de crecimiento activo, para que rápidamente contrarresten el efecto deteriorativo de la carga bacteriana inherente al pescado no fresco.

En las industrias que producen conservas de productos marinos, suele ser el atún el que aporta el mayor volumen de desperdicio, pertenece al grupo de los peces óseos, sus características biológicas determinan que son peces pelágicos grandes, grasos que

almacenan lípidos en sus tejidos. La parte comestible del pescado se encuentra en un rango entre 34% y 65 %, lo que significa que un 35% a un 66% se consideran desperdicios. Las características químicas obtenidas de los ensayos elaborados en la empresa se detallan a continuación:

Tabla N° 1 Composición química del atún entero.

<i>Parámetro</i>	<i>Mín.</i>	<i>Var. Normal</i>	<i>Máximo.</i>
Proteína	6	16 – 21	28
Lípidos	0,1	0,2-2.5	6,7
Carbohidratos		<0.5	1
Ceniza	0,4	1,2-1,5	1,5
Agua	28	66-81	96

Esta composición varía de acuerdo a la estación, a la edad, sexo, medio ambiente si se encuentra en desove o no. Estas variaciones están estrechamente relacionadas con la alimentación, ya que los peces tienen períodos de inanición por razones naturales o fisiológicas, o por factores como la escasez del alimento.

La Tabla N° 2 muestra, los porcentajes de humedad, proteína, grasa y cenizas de las partes no comestibles, esta información también fue obtenida de los ensayos elaborados en la empresa:

Tabla N° 2 Composición proximal de la parte no comestible del atún.

Localización de la rodaja	Humedad %	Proteína %	Grasa %	Cenizas %
Próxima a la cabeza	75,9	18,8	4,2	1,1
Centro	76,2	19,8	3	1
Próxima a la cola	77,2	19	2,6	1,2

II.1.1.2 Relación Pescado/Carbohidrato

Kopiang et al., 1980, programaron ensilados por fermentación natural mezclando pescado fresco con varios niveles de melaza. La relación pescado/melaza en peso fue de 100:5 (Ensilado A); 100:10 (Ensilado B); 100:15 (Ensilado C) y 100:20 (Ensilado D). El ensilado presentó un pH inicial de 7, el cual bajó a 4,5 luego de tres (3) días de fermentación y se mantuvo así, durante los veinte y un (21) días de almacenamiento, exceptuando el ensilado A, cuyo pH sólo bajó a 5 a los 3 días de almacenamiento, deteriorándose luego. El contenido de azúcar de todos los ensilados se redujo significativamente durante la fermentación. El contenido de proteínas no varió durante el almacenamiento, sin embargo, el porcentaje de nitrógeno soluble aumentó de 6% inicialmente a 25% después de 21 días de almacenamiento. Todos los ensilados, excepto el A, presentaron un fresco y fuerte olor a ácido. De este trabajo se deduce que la estabilidad del ensilado microbiano depende de la relación pescado/azúcar.

Ottati y Bello, 1990, elaboraron ensilado microbiano a partir de mezcla de pescados de la fauna de acompañamiento del camarón, melaza y un cultivo de *L. plantarum*. Se realizaron pruebas para determinar las propiedades mínimas de la melaza e inóculo. Tales pruebas consistieron en variar la concentración de la melaza (5%, 10% y 15%) e inóculo en peso (0%; 0,5%; 1%; 2,5%; 5% y 10 %). Los resultados indicaron que 1% en peso de inóculo y 15% en peso de melaza, fueron suficientes para producir un ensilado estable.

II.1.1.3 Tipo de Microorganismo y de Sustrato

Existen diferencias entre los microorganismos ácido-lácticos en cuanto a su capacidad para adaptarse a mezclas de pescados/carbohidratado y producir las cantidades de ácido requeridas para la preservación del producto. En este sentido, *L. plantarum* se ha señalado como un microorganismo exitosamente utilizado en la elaboración de ensilado de pescado (Lindgren y Pleje, 1983; Valderrama, 1987).

Van Wyk y Heydrenrych, 1985, prepararon varios ensilados microbianos de pescado empleando diferentes cepas de *L. plantarum* y diferentes fuentes de carbohidratos. Ellos señalan a *L. plantarum* L450 y *L. plantarum* L1533 como las mejores cepas para fermentar el pescado y a la melaza como mejor fuente de carbohidratos de fermentación directa en comparación con suero de leche.

Valderrama, 1987, preparó ensilado microbiano de pescado a partir de tres sustratos (harina de arroz, almidón de maíz y melaza) y tres microorganismos (*Streptococcus lactis*, *L. plantarum* y *Cándida lipolítica*) concluyendo al final de la experiencia que el ensilado más estable se obtuvo empleando 11% en peso de *L. plantarum* y melaza como sustrato.

Guevara et al., 1989, elaboraron ensilados microbianos a partir de especies de pescado de la fauna de acompañamiento del camarón con 15% en peso de melaza y 1% en peso de inóculo. Se utilizaron seis tipos de inóculo con cultivos simples y mixtos, entre los que se citan *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *Streptococcus lactis* y mezclas de *L. plantarum* – *S. lactis*, *S. lactis* – *L. acidophilus* y *L. plantarum* – *L. acidophilus*. Comparando la eficiencia de los cultivos puros y mixtos para producir ácido láctico se encontró que el cultivo de *L. plantarum* presentó mejor comportamiento al respecto.

El nivel de inóculo empleado afecta la velocidad de fermentación. En este sentido, Lindgren y Pleje, 1983, probaron con diferentes concentraciones de inóculo estudiando su efecto sobre la velocidad de disminución de pH. Ellos reportan un descenso de pH hasta 4,7 en las primeras 24 horas de fermentación del ensilado con 5% a 10% en peso de inóculo. Este mismo valor de pH fue alcanzado con 1% en peso de inóculo en 48 horas.

Recientemente los esquemas de elaboración de ensilado de pescado vía microbiana contemplan el uso de yogurt comercial, el cual está constituido por dos tipos de bacterias que son *Lactobacillus bulgaricus* y el *Streptococcus thermophilus*

Los *Lactobacillus bulgaricus* son bacilos, generalmente largos y delgados, que forman cadenas. Son microaerófilos, aunque existen algunos anaerobios estrictos, catalasa negativo y gram positivos, fermentan los azúcares dando ácido láctico como producto principal. Son homofermentativos es decir que producen mayormente ácido láctico, y únicamente pequeñas cantidades de ácido acético y dióxido de carbono e indicios de otros productos, la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C o incluso superiores.

Otro de los productos originados por los *Lactobacillus* es el peróxido de hidrógeno, que se produce por carecer del enzima peroxidasa, este peróxido es efectivo para inhibir el crecimiento de los patógenos *Pseudomonas* y *Staphylococcus aureus*.

Los *Streptococcus* desde el punto de vista alimenticio se clasifican en cuatro grupos; piogenos, viridans, lactivos y enterococos.

En el grupo viridans se encuentran los *Streptococcus thermophilus*, los cuales se multiplican entre 37 °C y 40 °C, pero también se desarrolla a 50°C. Es una especie homofermentativa termoresistente, que sobrevive a un calentamiento a 65°C durante 30 minutos. Es acidificante, es microaerófilo y soporta muy bien los medios ácidos pH 4 a pH 4,5 El *Streptococcus thermophilus* y el *Lactobacillus bulgaricus* viven en estrecha simbiosis, pues ambos producen más ácido láctico que cuando crecen aislados.

Areche et al., 1989, estudiaron la utilización de las bacterias del yogurt (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) en residuos de pescado a fin de producir ensilados. Ellos ensayaron con diferentes concentraciones en peso del mencionado inóculo (0%; 3,5%; 5%; 7,5% y 10%), encontrando un descenso de pH hasta 4,7 en las primeras 24 horas en los ensilados con una concentración de inóculo superior a 3% en peso. Los ensilados con una concentración de inóculo inferior, tardaron 48 horas en alcanzar el mencionado valor de pH. Esto se debe a que a una mayor cantidad de inóculo, favorece el control de la fermentación por estos microorganismos desde el principio. También, se observó producción de ácido y

disminución de pH en los ensilados sin inóculo debido a la participación de los microorganismos que se encuentran en forma natural como contaminante de las vísceras, residuos de pescado, carbohidratos incorporados, etc.

En algunas regiones se ha elaborado exitosamente ensilado por fermentación natural (sin adición de inóculo) debido a la riqueza de la materia prima en bacterias lácticas, sin embargo en otras regiones, ha sido necesario la adición de inóculo para producir un ensilado estable (Kompang et al., 1980). Como la cantidad y tipos de bacterias que producen esta fermentación natural es desconocida, es posible que las bacterias productoras de ácido puedan presentar cierta dificultad para controlar el proceso de acidificación, debido al antagonismo que presenta con la flora putrefactiva, lo que explica la lentitud en los cambios de pH en ensilados con poca o ninguna concentración de inóculo. Por tal razón, no siempre se puede asegurar que los cambios producidos serán los deseables, habiéndose observado putrefacción en algunos ensilados sin inóculo (Areche et al., 1989). Esto muestra la importancia del empleo de inóculo para asegurar que se produzca la fermentación deseada.

II.1.1.4 Componentes Solubles

La incorporación de azúcares contribuye de igual manera a la preservación del producto durante las etapas iniciales del proceso de fermentación ya que reprime la acción de las bacterias putrefactivas sobre las enzimas, liberando amonio de los aminoácidos contenidos en las enzimas. Una cantidad relativamente alta de carbohidratos debe añadirse al pescado para asegurar una preservación adecuada del producto. Existen diferentes carbohidratos que pueden ser utilizados como sustrato en la elaboración de ensilado microbiano, sin embargo, si la fuente de carbono es un carbohidrato complejo, harina de yuca por ejemplo, el producto requerirá de la adición de un agente amilolítico que convierta el almidón de la harina utilizada, en un azúcar fermentable por las bacterias ácido-lácticas, que son microorganismos incapaces de sintetizar tales enzimas (Raa y Gildberg, 1982). Las melazas son otra

fuelle de azúcar fermentable que suele utilizarse con frecuencia para preservar desechos de pescado (Roa, 1965; Rattagol et al., 1980; Kompiang y Cheswell, 1980).

El proceso de conversión de carbohidratos a ácido láctico es anaeróbico y se divide en tres etapas. Inicialmente, el almidón de la fuente de carbohidratos es hidrolizado a maltosa por α amilasa y β amilasa. La maltosa es convertida posteriormente a glucosa por maltasa para ser transformada posteriormente en ácido láctico por las bacterias lácticas (Stanton y Yeoh, 1977).

Otra fuente de carbohidratos alternativa para la elaboración de ensilado microbiano de pescado es la melaza, un subproducto de la producción del azúcar, es una de las fuentes más baratas de carbohidrato. Además de una gran cantidad de azúcar, las melazas contienen sustancias nitrogenadas, vitaminas y elementos traza.

La composición de la melaza puede variar debido a la materia prima utilizada para la producción de azúcar, las condiciones climáticas, el proceso de producción de cada factoría, y en especial de la localidad.

La melaza cuenta con aproximadamente 14% de glucosa libre, aparte de un 35% de sacarosa en su composición, un máximo de 25% de agua, y un 5% de cenizas y las bacterias posiblemente tienden a atacar primero la glucosa libre y luego desdoblar la sacarosa.

Tabla N° 3 Composición química de la melaza.

Parámetros	Valores
Materia seca (%)	77 – 84
Sacarosa (%)	33,4
Azúcar invertido (%)	21,2
N (%)	0,4 – 1,5
P203 (%)	0,6 – 2,0

Continúa

Tabla N° 3 Composición química de la melaza. (Continuación)

Parámetros	Valores
CaO (%)	0,1 – 1,1
MgO (%)	0,03 – 0,1
K ₂ O (%)	2,6 – 5,0
Tiamina (µg/100g)	830
Riboflavina peso (µg/100g)	250
Piridoxina seca (µg/100g)	650
Niacinamida (µg/100g)	2100
Ácido pantoténico (µg/100g)	2140
Ácido fólico (µg/100g)	3,8
Biotina mcg/g (µg/100g)	120

Fuente: Bello, R., Cardillo, E. y Martínez, R. 1993a.

II.1.2 Enzimas Proteolíticas

Las enzimas proteolíticas involucradas en el proceso de digestión del pescado se clasifican en cuatro grupos:

II.1.2.1 Enzimas de las vísceras y del tracto digestivo

Estas enzimas (tripsina, quimotripsina, pepsina) son las más activas en la degradación e hidrólisis de las proteínas del pescado, particularmente a pH ácido, especialmente la pepsina estomacal y la tripsina de los ciegos pilóricos. De estas enzimas viscerales, la tripsina exhibe la mayor actividad proteolítica a los valores de pH hallados en los procesos de fermentación. Estas enzimas presentan variaciones en su actividad y estabilidad en las diferentes especies de pescado (Mackie, 1971).

La actividad de las enzimas del tracto digestivo con relación al pH ha sido objeto de intensa investigación en Noruega. Cuando se mide la actividad de las proteasas extractables del tracto digestivo del capelán durante la incubación con hemoglobina, la actividad máxima se encuentra a pH 3 y pH 9, mientras que la misma corresponde a pH neutro con glicoproteínas extraídas de la piel del capelán. Por otro lado el efecto solubilizante de las proteasas sobre el tejido muscular parece tener un óptimo a pH 4 y pH 7 mientras que el efecto sobre la piel presenta un óptimo a pH 4. Se ha sugerido que estas diferencias en la actividad proteásica y pH óptimo dependen tanto de si el sustrato es tejido intacto (que contiene inhibidores enzimáticos del tejido, colágeno, etc.) como de las proteínas solubles (Raa y Gildberg, 1980; Hjelmeland y Raa, 1980).

La actividad de las enzimas proteolíticas que causan la hidrólisis del ensilado se incrementa con la temperatura de almacenamiento, dentro de un estrecho rango de temperaturas. Raa y Gildberg, 1977, establecen que para propósitos prácticos, la mejor temperatura para el proceso de autólisis es cercana a 30°C, ya que a temperaturas inferiores el proceso es muy lento. En este sentido, Mackie, 1971, señala que la temperatura óptima de hidrólisis del pescado por acción de las enzimas viscerales está en el rango de 35°C a 45°C. Raa y Gildberg, 1982, reportan que la máxima velocidad de autólisis se obtiene alrededor de 50°C, pero a esta temperatura las proteínas disueltas debido a la autólisis, precipitan.

II.1.2.2 Enzimas del tejido muscular

Las catepsinas contenidas en los lisosomas celulares, son las endo-enzimas musculares de mayor actividad proteolítica, tanto en condiciones ácidas como alcalinas, variando su nivel de actividad y los subtipos presentes según las especies. La actividad óptima de las catepsinas se ejerce a bajos valores de pH y, por lo tanto, su papel es secundario cuando el proceso de fermentación se realiza fuera de estos rangos (Bertullo, 1980).

II.1.2.3. Enzimas Vegetales añadidas

Según Mackie, 1971, varios investigadores han utilizado la bromelina, extraída del jugo de piña (*Ananas comusus*) y la papaína, proveniente del látex de lechosa (*Carica papaya*) para digerir pescado.

La papaína es la enzima proteolítica más ampliamente usada en la industria de alimentos y es, entre el grupo de enzimas proteolíticas cristalinas, una de las mejor caracterizadas.

El término papaína fue introducido en 1879 por Wurtz para describir un principio proteolítico presente en el látex de la lechosa (*Carica papaya*); hoy en día es aplicado tanto al látex crudo seco, el cual realmente contiene una mezcla de enzimas, como a la enzima proteolítica cristalina. El látex de la fruta verde presenta actividad proteolítica máxima, que luego decrece a medida que la fruta madura. Sin embargo en la lechosa madura queda actividad residual suficiente como para alterar el sabor de la pulpa especialmente cuando se mezcla con leche, originando un sabor amargo el cual es debido a la caseína hidrolizada (Amaral, 1981).

La papaína tiene un óptimo de actividad a pH neutro y es estable a temperaturas relativamente altas como 70°C (Reed, 1969). Careño en 1979, señala que la actividad de la papaína aumenta progresivamente desde pH 6 hasta pH 7,5 donde alcanza su máxima actividad.

La bromelina, al igual que la papaína, cataliza la hidrólisis de los sustratos proteicos, así como la de los sustratos sintéticos. La caseína es el sustrato más comunmente usado para determinar su actividad.

La bromelina se encuentra en los tejidos de las plantas de la familia Bromeliaceae, de las cuales la piña, *Ananas comusus*, es la más conocida mostrando actividad enzimática en diferentes partes de la planta como tallo, hojas y fruta. La enzima proteolítica obtenida del tallo de la piña fue llamada bromelina y la de la fruta bromelain.

Rivas, 1982, reporta que la mayor actividad proteolítica se encuentra en las coronas y jugo de piña y la menor la exhibe la corteza de la fruta, observándose también mayor actividad en las frutas verdes que en las maduras.

La resistencia térmica de la bromelina es inferior a la de la papaína ya que se inactiva a temperaturas superiores a 55°C (Reed, 1969). Otros investigadores señalan que un calentamiento a 55°C por 20 minutos, causa pérdida de hasta un 50% de la actividad enzimática (González, 1983).

La excelente composición en aminoácidos que presenta el músculo de pescado, lo convierte en una materia prima muy valiosa para la producción de concentrados proteínicos solubles altamente nutritivos.

Una de las técnicas para elaborar estos concentrados, se basa en la utilización de enzimas comerciales adicionales al músculo del pescado. Las enzimas comerciales más estudiadas para este fin han sido la pepsina, la ficina, la tripsina, la papaína y la bromelina.

Mcbride et. Al., 1961, compararon la eficiencia proteolítica de las enzimas pepsina y bromelina en la solubilización de la proteína del arenque (*Clupea harengus*) encontrando que la pepsina presentaba mayor eficiencia.

Keyes y Meinke, 1966, reportan que se han utilizado combinaciones de enzimas autolíticas con otras enzimas para el procesamiento de pescados para la alimentación de aves.

Lum, 1969, reporta que las enzimas autolíticas son útiles en la obtención de productos líquidos de pescado.

La actividad digestiva de más de 20 enzimas proteolíticas comerciales sobre un sustrato proteínico de pescado en las condiciones óptimas de temperatura y pH para cada enzima, ha sido objeto de estudio por Hale, 1969. Luego de 24 horas de digestión concluyó que la papaína, pepsina y pancreatina presentaban una buena

actividad y un costo moderado; la ficina parece ser más conveniente para períodos cortos de hidrólisis, mientras que la pronasa, proteasa fúngica de *Streptomyces griseus*, es la más activa. Basado en el menor costo por unidad de actividad proteolítica, las enzimas más adecuadas fueron pancreatina, pepsina y papaína. La pepsina a pH 2 y la papaína a alta temperatura pueden ser usadas con poco peligro de contaminación microbiana.

Es importante tomar en cuenta que los hidrolizados proteínicos elaborados con papaína y bromelina poseen generalmente un buen valor nutritivo y no presentan problemas de toxicidad como consecuencia de la actividad enzimática (Meinke, 1959,1964; Instituto de Fomento Pesquero de Chile, 1970; Ballester et al., 1977). Se ha reportado además que la papaína muestra una importante función en la liberación de varias de las vitaminas del grupo B desde sus formas ligadas en el tejido original (Sen et al., 1962).

Trabajos realizados por Beddows et al., 1976, en la elaboración de salsa de pescado a partir de un homogeneizado de macarela (*Rastrellinger canaqrta*), muestran que la bromelina aumentó la velocidad y extensión de la proteólisis operando en un rango de pH comprendido entre pH 4 y pH 5,5. Medidas del grado de hidrólisis y de la conversión de los compuestos nitrogenados insolubles a solubles después de 14 días de incubación a 38°C, mostraron que el grado más alto de hidrólisis fue obtenido con la adición de bromelina al 0,2% en peso.

Investigaciones realizadas por Hevias y Whitaker, 1976, en el hidrolizado proteico de pescado obtenido por tratamiento con la enzima pronasa, muestran que se produce menos sabor amargo que el obtenido por el tratamiento con la bromelina y ficina, pero, a pesar de su actividad, su potencial está limitado por su alto precio.

Beddows y Ardeshir, 1979, estudiaron el efecto de bromelina y papaína sobre la velocidad de hidrólisis del pescado, medida como incremento de nitrógeno soluble. Inicialmente ambas enzimas presentaron una velocidad de hidrólisis similar, sin embargo luego de 40 días de almacenamiento a 33°C, la bromelina presentó un

porcentaje de conversión de proteína a nitrógeno soluble superior en un 20% al exhibido por la papaína. La superioridad de la bromelina sobre la papaína también ha sido citada por Baixeras, 1982, quien elaboró hidrolizados proteicos a partir de pepitona (Arca zebra) con estas dos enzimas. El hidrolizado obtenido con bromelina presentó ventajas sobre el elaborado con papaína en función de los valores de la calidad biológica, del rendimiento del producto elaborado y del nitrógeno soluble.

Hale, 1983, ajustó exitosamente las condiciones de pH a 7 en sus estudios de hidrólisis con esta enzima. Das et al., 1979, obtuvieron resultados similares con la utilización de papaína en la hidrólisis enzimática de un concentrado proteico de pescado; ellos reportaron un rendimiento ligeramente superior de esta enzima a valores de pH comprendidos entre pH 6 y pH 7.

Groninger Jr. Y Miller, 1975, condujeron la hidrólisis de la proteína de pescado “rockfish” con bromelina ajustando las condiciones de pH a 7.

Koury et al., 1971, trabajando con merluza (*Merluccius gavi*) encontraron que diferencias de edad y hábitos alimentarios existentes entre individuos de diferentes comunidades de una misma especie, pueden ser el motivo para alterar las condiciones óptimas de pH en la hidrólisis enzimática del pescado.

Tal y como lo reportan Sen et al., 1962, la papaína rinde la mayor recuperación de nitrógeno en la hidrólisis de la proteína de pescado a 40°C lográndose las condiciones óptimas a pH 7 y temperatura de 40°C.

Koury et al., 1971, encontraron que la velocidad proteolítica enzimática natural de la merluza entera incrementa a 40°C.

Por otra parte, Beddows et al., 1976, consideran una temperatura de 38°C como la más deseable en la elaboración de una salsa de pescado utilizando bromelina para la proteólisis, mientras que Das et al., 1979, reportaron que el mayor rendimiento de la papaína en la hidrólisis de un concentrado proteínico de pescado se obtuvo entre 35°C y 40°C.

Baixeras et al., 1982, encontraron que ambas enzimas presentan un óptimo de actividad catalítica a una temperatura de 40°C cuando la pepitona es usada como sustrato, mientras que a 45°C tanto la bromelina como la papaína presentan el menor rendimiento en la hidrólisis de la proteína de la pepitona, que según Reed, 1975, es la temperatura a la cual son inactivadas muchas enzimas utilizadas en el procesamiento de alimentos.

Recordando que existen dos factores que tienen efectos opuestos sobre la velocidad de la reacción enzimática: a bajos valores de energía libre de activación, se obtiene considerables aumentos en la velocidad de reacción cuando se incrementa la temperatura, sin embargo, las altas temperaturas también ocasionan una pérdida gradual de las propiedades catalíticas de las enzimas. La temperatura óptima de estas reacciones se encontrará en aquel rango intermedio en el cual el grado de hidrólisis se haga máximo dependiendo de ambos factores (Reed, 1975).

Sen et al., 1962, informaron haber tenido los mayores rendimientos en la recuperación de sólidos solubles del pescado con papaína en una concentración de 0,25% (peso enzima/peso de carne). Groninger y Miller, 1975, reportaron el grado óptimo de hidrólisis de la proteína de pescado con bromelina en una relación de enzima a proteína de 1:100 – 1:200; en tanto que Beddows et al., 1976, reportaron haber logrado un elevado grado de proteólisis de macarela con bromelina al 0,2% en peso.

De acuerdo a Baixeras, 1982, las concentraciones adecuadas de bromelina y de papaína para la elaboración de un hidrolizado de pepitona con fines industriales son 0,2% y 0,3% (peso enzima/peso de carne) respectivamente (relación de enzima/proteína aproximadamente de 1:90 y de 1:60 respectivamente), que constituyen satisfactoriamente cantidades de enzima relativamente pequeñas dado que debe mantenerse el criterio de mayor rendimiento hidrolítico con la mayor economía del proceso.

II.1.2.4 Enzimas Microbianas

Avdalov et al., 1989, señalan la elaboración de ensilado de pescado utilizando una levadura proteolítica conocida como *Hansenula Montevideo*, la cual fue originalmente aislada de la superficie del hígado de merluza y luego de estudiar sus propiedades bioquímicas fue adaptada a un bios específico que resaltó sus propiedades proteolíticas en detrimento de su natural capacidad alcohológena.

II.1.3 Métodos de elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado

El ensilado de pescado se puede definir como un producto líquido obtenido por la acción natural de enzimas sobre el pescado entero o de sus partes, y preservado en condiciones ácidas (Hall et al., 1985). El proceso de ensilaje se caracteriza principalmente por una autodigestión (autólisis) del pescado, lo cual trae como resultado una hidrólisis del producto.

Existen básicamente dos métodos para producir ensilado de pescado (Raa y Gildberg, 1982): por adición de ácidos minerales y orgánicos al pescado tales como: ácido sulfúrico, clorhídrico, fórmico, propiónico, etc. (Tatterson y Windsor, 1974); Córdova, 1984; Rodríguez et al., 1988). A este método se le denomina ensilado químico. Estos ácidos actúan acelerando el proceso de hidrólisis ya que crean las condiciones favorables para la acción proteolítica de las enzimas, además de evitar el deterioro microbiano no permitiendo la proliferación de microorganismos en el producto (Tatterson, 1982).

El otro método ensilado microbiano o biológico, consiste en la sustitución de los ácidos orgánicos y minerales por la adición de un cultivo iniciador de bacterias ácido lácticas al pescado, junto con la fuente de carbohidratos para producir la fermentación láctica por los microorganismos. El ácido láctico producido por el cultivo va a ejercer la función de los ácidos en el ensilado químico; es decir, va a ser responsable de la preservación del pescado.

La mayoría de las investigaciones se han dirigido hacia el ensilado microbiano por resultar más económico, más fácil de administrar a los animales, pues no requiere de neutralización previa, y ser de mayor valor nutricional que el ensilado químico (Kompang et al., 1980).

Se han realizado numerosas modificaciones en relación al tipo de materias primas, así como a las proporciones empleadas en las mismas en la elaboración del ensilado de pescado; todas ellas adaptadas a las condiciones prevalecientes en el lugar de estudio.

Carl, 1952, citado por Petersen, 1953, y Bertullo, 1975, obtuvo en un período de 4 días de almacenamiento, un producto de calidad adecuada al mezclar 80 Kg de pescado molido con 15 Kg de melaza y un cultivo de bacterias ácido lácticas (*Streptobacterium plantarum*).

Petersen, 1953, elaboró ensilado de pescado por vía química mezclando 100 Kg de pescado, 26Kg de melaza y 2lt de ácido sulfúrico al 50% en peso, señalando que la preservación del producto se debió a una reducción de pH a valores de 4,5 y por los efectos de los azúcares y sales contenidas en la melaza.

En Uruguay se ha preparado ensilado vía microbiana desde 1953 utilizando para ello diferentes tipo de especies de pescado y de desperdicios, los cuales han sido molidos y mezclados con 15% en peso de melaza proveniente de caña de azúcar o de remolacha y 1% en peso de inóculo de *Sacharomyces platensis*.

Nilsson y Ryddin, 1963, citado por Raa y Gildberg, 1982, añadieron 20Kg de una melaza seca de harina de cebada y de harina de avena a 100Kg de arenque fresco. La harina de cebada fue esencial para la preservación, ya que sus enzimas amolíticas convierten el almidón, carbohidrato complejo, de la harina de avena en glucosas, azúcar fácilmente fermentable por las bacterias productoras de ácido láctico.

Roa, 1965, desarrolló una metodología para la preparación de ensilado microbiano utilizando arenque mezclado con 10% en peso de melaza, en combinación con un

cultivo iniciador de la especie de *Lactobacillus plantarum* 8531, almacenando el producto a 30 °C.

Por su parte, James, 1986, citado por Chakraborty y Arul, 1976, desarrolla un método para la producción de ensilado de pescado utilizando la fermentación ácido láctica de pescado precocido en presencia de *L. plantarum* NCIB 6105. Se encontró que el producto constituía un suplemento nutricional adecuado para la alimentación animal.

Una nueva levadura proteolítica denominada *Hansenula Montevideo* spp. nova, descubierta por Bertullo, 1970, en presencia de pescado o sus desechos molidos, un azúcar fermentable, sea éste melaza de caña o de remolacha, frutas maduras molidas, cebada malteada o tubérculos tales como papas o batatas cocidas, es capaz de hidrolizar la proteína del sustrato. Se obtiene un producto líquido pastoso de buena conservabilidad y de suministro directo a los animales tanto bajo la forma líquida como deshidratada.

Yeoh, 1980, preparó ensilados por fermentación ácido-láctica bajo las condiciones imperantes en el Sureste Asiático. Para ello empleó especies de pescado de la fauna acompañante del camarón mezcladas con harina de yuca, “ragi” (agente amilolítico constituido por mohos y levaduras cultivadas en harina de arroz) y un cultivo de bacterias lácticas provenientes de productos fermentados del tipo SauerKraut o Kim-Chi, obteniendo una mezcla de microorganismos productores de ácido tales como *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. cereviseae*. La temperatura utilizada para la elaboración del ensilado fue de 29°C.

Kompiang et al., 1980, prepararon varios ensilados microbianos de pescado por fermentación anaeróbica natural con melaza (sin adición de inóculo). Ellos probaron con (5%, 10%, 15% y 20%) en peso de melaza, encontrando mayor estabilidad en los ensilados con 15% y 20% en peso de melaza. Esta investigación demostró que se puede preparar un ensilado adecuadamente, sin la adición de inóculo, pero es necesario, que la proporción de melaza sea al menos de 10% en peso.

Tibbets et al., 1981, elaboraron ensilado de pescado microbiano utilizando pescado proveniente del material de descarte de las embarcaciones que realizan la pesca de arrastre del camarón, el cual fue mezclado con maíz, melaza y un cultivo de bacterias ácido lácticas. Las proporciones de la mezcla fueron: 60% de pescado sub-utilizado, 25% de maíz, 5% de *L. plantarum* y 10% en peso de melaza. El ensilado así obtenido resultó de muy buena calidad mostrando un olor a fermentado, no habiendo indicios de rancidez ni de putrefacción durante el almacenamiento.

El empleo de los desechos de pescado también fue utilizado por Lindgreen y Pleje, 1983. Estos autores elaboraron 3 ensilados microbianos, todos ellos contenían 70% de desechos de arenque, 10% en peso de una mezcla de cereales (avena y cebada) en una proporción 1:1, 10% en peso de melaza y 10% en peso de un cultivo fermentador constituido por una mezcla que contenía *P. ácidolactici* y *L. plantarum*. El ensilado A no contenía ningún agente antimicótico, el ensilado B contenía 0,1% de ácido sórbico y el ensilado C contenía 0,3% en peso de ácido propiónico. Los tres ensilados fueron almacenados a 24°C durante 4 días encontrándose características adecuadas en los ensilados B y C.

Al evaluar los factores que favorecen una rápida fermentación láctica en el ensilado de pescado, Twiddy et al., 1987, probaron con diferentes mezclas pescado/carbohidratos y encontraron que 80% de pescado mezclado con 20% de casabe prefermentado (inoculado con 0,05% de cultivo iniciador e incubado a 30°C por 24 horas) y 2% en peso de glucosa, condujo a una rápida fermentación, en la cual el pH alcanzó valores inferiores a 4,5 en las primeras 48 horas.

El pH y la acidez son los índices de mayor importancia que deben ser controlados durante el proceso fermentativo ya que un aumento del pH es indicativo de actividad bacteriana putrefactiva en el producto (Jayawardena y Poulter, 1980).

Reyes et al., 1991, reportaron que se obtenían valores de pH inferiores a 4,5 en un tiempo de 24 horas, en ensilados elaborados con pescados enteros de bajo valor comercial, 15% de melaza y 1% de inóculo almacenados a 30 °C, 35 °C y 25 °C.

Lessi et al., 1987, elaboraron exitosamente ensilados de pescado con fermentos microbianos-enzimáticos obtenidos a partir de la fermentación de varios vegetales como repollo (*Brassica oleracea*), cambur (*Musa sapientum*), lechosa (*Carica papaya*) y piña (*Ananas comusus*).

Valderrama, 1987, evaluó la calidad de ensilado obtenidos a partir de diferentes fuentes de carbono como harina de avena, de arroz, de yuca, melaza y diferentes microorganismos productores de ácido (*L. plantarum*, *Streptococcus lactis* y *Cándida lipolítica*), encontrando mayor eficiencia fermentativa al mezclar pescado molido con 15% de melaza o harina de avena, adicionado con 11% en peso de inóculo. La harina de avena requirió de 2% en peso de malta de cerveza como agente amilolítico.

Reyes et al., 1991, elaboraron ensilado microbiano de pescado adicionando desechos de frutas tropicales, concluyendo que la adición de desechos de lechosa-piña, con almacenamiento a temperaturas superiores a la ambiental, incrementa notablemente la hidrólisis del ensilado.

II.2 CAMBIOS DURANTE LA PRODUCCIÓN Y EL ALMACENAMIENTO DEL ENSILADO

II.2.1 Proteínas

Durante el almacenamiento del ensilado de pescado, las proteínas son fragmentadas enzimáticamente a péptidos de bajo peso molecular y a aminoácidos libres, lo cual se manifiesta por un aumento en la hidrólisis del producto.

Tatterson y Windsor, 1974, reportan valores de nitrógeno soluble entre 10% y 20 % en ensilado ácido recién preparado, los cuales aumentan a 75% luego de 10 días a 23°C.

Por su parte, Lindgren y Pleje, 1983, señalan que un 20% del nitrógeno presente en el pescado, durante la obtención del ensilado microbiano, se solubiliza en ácido tricloroacético, aumentando a más de un 50% luego de una semana de fermentación ácido-láctica a 24°C.

La actividad proteolítica es atribuida principalmente a las enzimas de las vísceras del pescado. La evaluación de la actividad proteolítica del ensilado de arenque con o sin vísceras, indica que éstas contienen una proteasa con actividad a pH 4,4 que disminuye durante el almacenamiento (Lindgren y Pleje, 1983).

Van Wyk y Heidenrich, 1985, compararon el contenido de proteínas y de triptofano del ensilado microbiano y químico del pescado luego de 6 meses de almacenamiento, encontrando que mientras el contenido de proteínas era similar en ambos ensilados, el contenido de triptofano era superior en el ensilado microbiano, lo que fue atribuido a que este aminoácido es lábil en estado libre bajo las condiciones ácidas en el rango comprendido entre pH 2 y pH 3,5 que se ha reportado para los ensilados químicos.

II.2.1.1 Hidrólisis

La hidrólisis del sustrato proteico se debe a la degradación de los tejidos por acción de las enzimas presentes naturalmente en el pescado. Si bien el mecanismo de hidrólisis se desconoce, se presume que la autólisis es debida principalmente a la actividad de las enzimas presentes en las vísceras, lo cual se evidencia cuando el ensilado se elabora con desechos de músculo (Tatterson y Windsor, 1974).

Backoff, 1976, estimó el grado de hidrólisis a través de mediciones del nitrógeno no proteico (NNP) en ensilados ácidos donde se utilizan diferentes partes del pescado almacenados a 30°C. La velocidad de proteólisis en los ensilados de piel y vísceras fue alta durante las primeras 24 horas. El ensilado elaborado con músculo mostró poca actividad proteolítica; esta actividad ha sido atribuida a las catepsinas (Lindgren y Pleje, 1983).

La velocidad de autólisis está determinada por la actividad de las enzimas digestivas, la condición fisiológica del pez, el pH, la temperatura y ácidos presentes (Raa y Gildberg, 1982); es favorecida por pH ácidos y por temperaturas superiores a la del ambiente (Lindgren y Pleje, 1983). No es afectada por congelación previa de la materia prima (Gildberg y Raa, 1977).

Durante la proteólisis, el ensilado se separa en 3 fases: una fase lipídica, una fase acuosa (rica en proteínas y aminoácidos esenciales, lo que la hace de gran valor nutricional) y un sedimento insoluble compuesto por proteína no digerida, rico en cistina lo que sugiere que los puentes de disulfuro son responsables de la resistencia parcial de esas proteínas a ser hidrolizadas (Raa y Gildberg, 1976).

Hall et al., 1985, señalaron que debe tenerse cuidado en las extrapolaciones de los resultados obtenidos en los ensilados químicos producidos con especies de pescado provenientes de aguas templadas y los de aguas tropicales, ya que existen diferencias en cuanto al grado de proteólisis, medida a través del nitrógeno no proteico soluble.

Es interesante señalar que los cambios químicos que ocurren en el ensilado como consecuencia de la autólisis van acompañados por cambios físicos como disminución de la consistencia (Tatterson y Windsor, 1974), ya que a medida que esta progresa, se producen compuestos nitrogenados, como péptidos, aminoácidos, aminas, amonio y otros compuestos de bajo peso molecular.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

A continuación, se presenta el diagrama de flujo en el cual se muestran los pasos seguidos y la metodología que se llevó a cabo para alcanzar los objetivos propuestos.

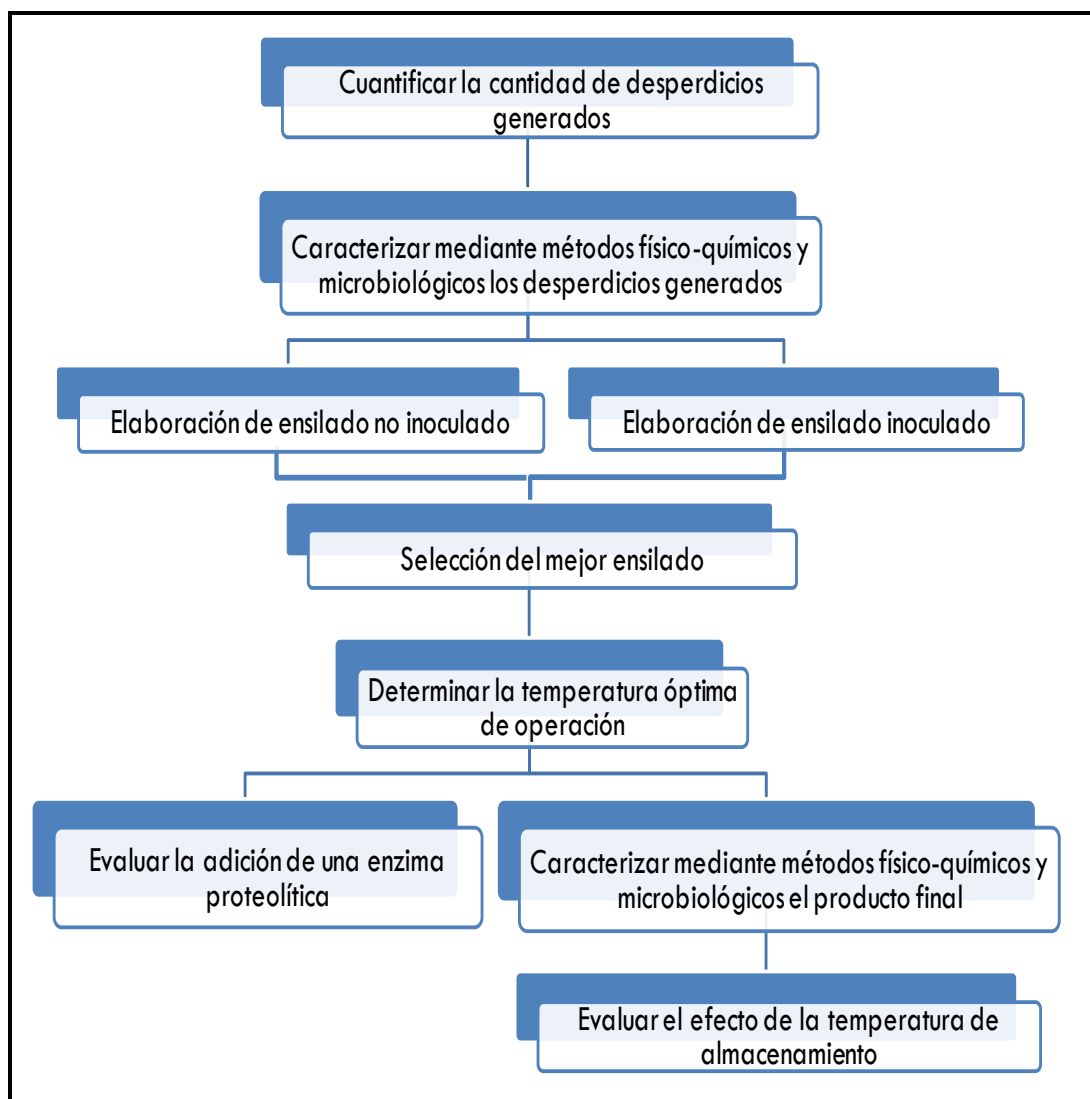


Figura N° 1 Flujograma de la metodología empleada

III.1 Cuantificar la cantidad de desperdicios generados en el procesamiento del atún y fileteado de diversas especies de pescado.

Se realizó un plan de muestreo de los desechos generados en el procesamiento de atún y de otras especies usadas en el proceso de elaboración de conservas de pescado para así conocer su estado actual.

Este plan de muestreo se efectuó de la siguiente manera: por 15 días, al final de cada jornada de trabajo (2 jornadas) se registró por línea de producción (7 líneas) los desperdicios generados por las mismas, una vez recolectados los datos se pudo procesar y así conocer su situación actual. Los desperdicios fueron recolectados en cestas que posteriormente se depositaron en un contenedor y al final de cada jornada se procedió a pesar determinando la cantidad de desperdicios generados por turno.

III.2 Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.

El criterio de inclusión a la materia prima para la elaboración de ensilado microbiano de pescado fue: todos aquellos pescados o residuos de pescados y camarón recién procesados y que carecían de partes descompuestas u olores desagradables provenientes de la descomposición de los mismos.

En el criterio de exclusión se encontró las cabezas y residuos de camarón que presenten más de 150 ppm de metabisulfito de sodio ya que este actúa como inhibidor de los enzimas y de las bacterias.

Los pescados que se emplearán en la elaboración del ensilado son: el atún conocido como albacora o yellowfin (*Thunnus albacares*) y sardina (*Sardinella Aurita*).

Toda la materia prima se lavó con agua clorada, luego se almacenó a una temperatura de congelación de -10°C hasta el momento de su procesamiento.

Se procedió a tomar 100 kg de la población los cuales se distribuyeron en 10

subgrupos de los cuales se tomaron las respectivas muestras (3) para seguir así con los procedimientos que permitieron la caracterización de físico-química y microbiológica. Una vez caracterizados cada uno de los subgrupos se procedió a presentar los valores como promedios con sus respectivas desviaciones estándar.

Fuente de Carbohidratos

La melaza que se empleó como sustrato para el desarrollo de los microorganismos fermentativos involucrados en el producto es proveniente del Central Azucarero de Cumanacoa.

De allí que, tanto la materia prima como el insumo anteriormente citado se caracterizó fisicoquímicamente y microbiológicamente para determinar la calidad de los mismos y así poder evaluar el impacto de cada uno de los parámetros en la elaboración del ensilado.

Otros de los insumos que se emplearon se describen a continuación:

Microorganismo

Como fuente de microorganismo se empleó *Lactobacillus bulgaris* y *Streptococcus thermophilus* contenidos en el yogurt comercial.

Ácido Sórbico

Se utilizó ácido sórbico, marca Riedel-de Haën, que fue incorporado al ensilado como agente antimicótico a razón de 0,25% en peso.

Enzimas Exógenas

Se utilizó bromelina y papaína, marca Sigma Chemical CO, que fue incorporado al ensilado como catalizador de la reacción.

III.3 Establecer las condiciones óptimas de operación para la producción de ensilado de pescado vía microbiana.

Los ensilados se elaboraron en recipientes plásticos con tapas, los cuales contenían (500 ± 0,1) g de materia prima y se les incorporó otros aditivos dependiendo de la experiencia.

Cada una de las experiencias se realizaron por triplicado a fin de que una vez establecida las condiciones óptimas de operación: inoculado o no inoculado, tipo de pescado, temperatura de operación, que favorecen la elaboración del ensilado, poder así caracterizar físico-químicamente y microbiológicamente el producto final, para luego proceder a evaluar la estabilidad en su posterior almacenamiento.

Los esquemas de elaboración de ensilado se definieron en base a las experiencias realizadas en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos por Ottati y Bello 1990 y Reyes et al 1991, los cuales elaboraron exitosamente ensilado microbiano de pescado usando: una relación pescado/fuente de carbohidratos 85:15 (% p/p), 1 % en peso inóculo y 0,25% en peso de ácido sórbico como agente antimicrobiano.

Una vez definidos los esquemas de elaboración se procedió a especificar cada una de las experiencias se describen a continuación.

Experiencia 1

Este ensayo se hizo con la finalidad de comparar como el uso de diversas porciones del pescado afecta al proceso de obtención del ensilado microbiano del pescado, y de esta manera determinar cuál de ellas es la más conveniente para optimizar el proceso

de elaboración del ensilado microbiano de pescado. El proceso fermentativo se siguió a través de determinaciones de pH, acidez, consistencia, nitrógeno no proteico y contajes microbianos; donde el pH es uno de los índices con mayor importancia que debe controlarse durante el proceso de elaboración de ensilado de pescado, ya que los cambios en el mismo son indicativos de la calidad deteriorativa del producto.

Se elaboraron 3 tipos de ensilados siguiendo el esquema de elaboración mostrado en la figura N° 1 (Anexo 2) pero sin adición de inóculo, a continuación se especifica su constitución:

Ensilado A: pescados enteros, incluyendo cabezas, vísceras, piel y escamas, melaza y ácido sórbico.

Ensilado B: pescados enteros, eviscerados, con cabezas, piel y escamas, melaza y ácido sórbico.

Ensilado C: músculo de pescados, melaza y ácido sórbico.

Experiencia 2

Para conocer el efecto de las bacterias ácido lácticas aportadas por el inóculo, sobre la hidrólisis de las proteínas del pescado así como en la producción de ácido y disminución de pH, se compararon los resultados obtenidos en la experiencia 1 con aquellos obtenidos de ensilados de pescados elaborados con adición de inóculo

Se elaboraron 3 tipos de ensilados siguiendo el esquema de elaboración mostrado en la figura N° 1 (Anexo 2), a continuación se especifica su constitución:

Ensilado A: pescados enteros, incluyendo cabezas, vísceras, piel y escamas, melaza, inóculo y ácido sórbico.

Ensilado B: pescados enteros, eviscerados, con cabezas, piel y escamas, melaza, inóculo y ácido sórbico.

Ensilado C: músculo de pescados, melaza y ácido sórbico.

Una vez establecido cuales son las condiciones (inoculado o no inoculado, tipo de pescado) que favorecen la elaboración del ensilado, se determinó en función a los resultados obtenidos en la experiencias anteriores el que permitió el hidrolizado en menor tiempo, que se evidenció a partir de la consistencia y de los valores de nitrógeno no proteico del mismo. Una vez establecido éste, se prepararon ensilados bajo el mismo esquema, donde se procedió a evaluar el efecto de la temperatura entre 15 °C y 55 °C en el almacenamiento a través de las determinaciones de: pH, acidez, consistencia, nitrógeno no proteico y contajes microbianos.

III.4 Evaluar la adición de una enzima proteolítica en la producción de ensilado de pescado vía microbiana.

Se dispuso de dos enzimas vegetales: papaína y bromelina y se procedió a determinar la actividad de estas enzimas sobre la caseína y carne de pescado (Anexo 3) para evaluar el efecto de la adición de una enzima proteolítica en la elaboración de ensilado microbiano de pescado.

Estas enzimas fueron suministradas por Sigma Chemical CO y las especificaciones son las siguientes:

Papaína

Polvo crudo proveniente del látex de la papaya. Una unidad hidroliza 1 μmol de BAEE (Benzoil-arginina-etil-éster) por minuto a pH 6,2 a 25°C. Contiene 2800 Unidades/ μg de sólido.

Bromelina

Proveniente del tallo de la piña. Contiene aproximadamente 50% de proteína (Biuret). Una unidad hidroliza 10mg de nitrógeno amínico a partir de la gelatina en 20 minutos a pH 4,5 a 45°C. Contiene 1870 Unidades/g de sólido y 3400 Unidades/g de proteína.

Caseína

Se utilizó para determinar la actividad caseinolítica de la bromelina y de la papaína. Marca Sigma CO. Grado Analítico.

A continuación se presenta la experiencia diseñada:

Experiencia 3

Esta experiencia se hizo con la finalidad de establecer como influyen las diversas concentraciones de bromelina sobre el grado de hidrólisis del ensilado y en el tiempo requerido para obtener un producto completamente líquido. Las bases de este ensayo se fundamentaron en los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas, donde se determinó la actividad de las preparaciones comerciales de las enzimas bromelina y papaína sobre caseína a los valores de pH considerados óptimos sobre este sustrato (pH 7,2 para la bromelina y pH 8,0 para la papaína; según método descrito por Kunitz 1947 y modificado por Amoon y Shapira 1967).

El efecto del tiempo es de gran importancia en el control de las reacciones enzimáticas en el procesamiento de los alimentos. En relación a esto, el criterio más comúnmente utilizado en los procedimientos de pruebas para determinar la actividad relativa de una enzima, es la medición de la velocidad de hidrólisis, sin considerar el grado de digestión obtenido, debido a que a veces la desintegración avanzada de las proteínas del sustrato implica períodos prolongados de tiempo que pueden ocasionar un indeseable incremento en el costo de elaboración del producto. Este es uno de los problemas que se han asociado con el uso de enzimas en la hidrólisis de las proteínas del pescado.

En este sentido, se elaboraron 5 tipos de ensilados que sólo diferirán en la concentración de bromelina adicionada, estas concentraciones se determinarán a partir del contenido de proteínas de la materia prima (se tomará como base estudios preliminares), el esquema de elaboración que se siguió se muestra en la figura N° 2 contenida en el Anexo 2 a excepción del ensilado control (no se le añadirá la enzima) que se elaboró según el esquema convencional mostrado en la Figura N° 1 en el mencionado anexo, a continuación se especifica su constitución:

Ensilado A: preparado con adición de 0,9% de bromelina.

Ensilado B: preparado con adición de 0,7% de bromelina.

Ensilado C: preparado con adición de 0,45% de bromelina.

Ensilado D: preparado con adición de 0,2% de bromelina.

Ensilado E: preparado sin adición de bromelina.

III.5 Realizar un control de parámetros físico-químico y fermentativo involucrado en la obtención del ensilado vía microbiana.

Diariamente se registró el pH para observar la evolución fermentativa de los ensilados.

La toma de muestras para la determinación pH como para el resto de las caracterizaciones, se realizó abriendo cada uno de los envases plásticos que contienen los ensilados para en primera instancia homogenizar toda la mezcla manualmente haciendo uso de una espátula, una vez homogenizada se procedió a tomar las muestras (3) con las que luego se seguirá el respectivo procedimiento para su caracterización.

Por otro lado se procedió a realizar un muestreo análogo al anterior por los primeros 15 días de almacenamiento para la evaluación físico-química de los ensilados. Para los análisis microbiológicos también se tomaron muestras en este mismo período ya

que la exposición de la mezcla reaccionante al medio ambiente que contiene oxígeno no es significativa para acelerar la actividad bacteriana putrefactiva.

III.6 Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos el producto final con el fin de determinar la calidad del mismo.

De forma análoga a la materia prima e insumo, el producto final obtenido de la formulación que presentó mejor rendimiento, se caracterizó fisicoquímicamente determinando: pH, humedad, proteína cruda, grasa, ceniza, carbohidrato y nitrógeno no proteico y microbiológicamente donde se realizó el conteo de aerobios mesófilos, mohos, levaduras, E. coli y salmonella, esto se realizó siguiendo el procedimiento expuesto en el Anexo 1.

III.7 Determinar la temperatura óptima para el almacenamiento del producto terminado.

Con el ensilado que presentó mejor rendimiento. Se procedió a evaluar la estabilidad del mismo, medido a través de las determinaciones de: pH, acidez, consistencia, nitrógeno no proteico y contajes microbianos por un tiempo de 90 días; donde se evaluó el efecto causado por la temperatura de almacenamiento. En este sentido el ensilado se almacenó a 30 °C y a 45 °C, la primera temperatura por ser la temperatura ambiente promedio y la última debido a que la empresa dispone esta área para a la incubación de los productos terminados.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el siguiente capítulo se presentan los resultados obtenidos en este Trabajo Especial de Grado, con su respectiva interpretación o análisis.

IV.1. Cuantificar la cantidad de desperdicios generados en el procesamiento del atún y fileteado de diversas especies de pescado.

A continuación se presenta la tabla N° 4, que contiene la cantidad de residuos generados durante los 15 días de muestreo de los dos turnos de producción y el total de la jornada.

Tabla N° 4 Residuos generados en el primer y segundo turno de producción.

DÍA	RESIDUOS (Kg ± 1)		
	I Turno	II Turno	Total Jornada
1	4.505	5.850	10.355
2	1.044	6.750	7.794
3	2.062	8.500	10.562
4	5.500	8.900	14.400
5	14.000	7.650	21.650
6	1.010	9.010	10.020
7	3.000	4.200	7.200
8	7.880	6.880	14.760
9	8.600	7.020	15.620

Continúa

Tabla N° 4 Residuos generados en el primer y segundo turno de producción. (Continuación)

DÍA	RESIDUOS (Kg) ± 1		
	I Turno	II Turno	Total Jornada
10	4.450	5.450	9.900
11	12.020	9.300	21.320
12	4.315	6.460	10.775
13	3.200	3.200	6.400
14	2.500	4.500	7.000
15	3.100	7.110	10.210

En esta tabla se evidencia que el comportamiento que presenta la generación de residuos en el primer turno de producción no posee una tendencia y por ende no se puede determinar los límites naturales del proceso. Estas variaciones se atribuyen a que la generación de residuos no solamente se ve afectada por la especie de pescados procesados, ya que el rendimiento de la materia prima es función de la talla de los mismos. Esta generación de residuos también es función de la calidad de las materias primas como se nota en los días 5 y 11 donde el incremento de los residuos se debe a cargas de sardinas fuera de especificaciones legales.

En el segundo turno se puede apreciar que al igual que el primer turno de producción, los residuos generados presentan un comportamiento que no se encuentra bajo control estadístico, también es de notar que los mismos aumentan como consecuencia de la mala manipulación de las materias primas en el primer turno de producción.

Respecto a la jornada, se observa que durante este período, los residuos generados son del orden de las 170 toneladas, la cual es destinada a la elaboración del subproducto generando problemas operativos debido al consumo energético que implica la operación de la planta de harina.

IV.2. Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.

A continuación se presenta la Tabla N° 5, donde se reporta los valores promedios con sus respectivas desviaciones correspondientes al pH y la composición proximal. También se presentan los valores de la caracterización microbiológica del pescado molido.

Tabla N° 5 Composición proximal, pH y caracterización microbiológica del pescado utilizado en la elaboración de los ensilados.

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	RESULTADO
Humedad (%)	76,50 ± 0,5
Proteína cruda (%)	17,14 ± 0,08
Grasa (%)	5,66 ± 0,18
Cenizas (%)	0,60 ± 0,03
pH	6,60 ± 0,01
N.B.V.T. (mg N/100g)	9,6 ± 0,24
PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS	RESULTADO
Aerobios Mesófilos (UFC/g)	2,5x10 ⁵
Mohos (UFC/g)	2x10
Levaduras (UFC/g)	8,8x10
E. coli (NMP/g)	7
Salmonella	Negativo

(UFC: unidades formadoras de colonias, NMP: número más probable)

En la Tabla N° 5, se muestra la composición proximal de la materia prima, estos valores obtenidos pueden compararse con los reportados por Ottati (1988); humedad

(65,90%), cenizas (0,74%), proteína (15,76%). Los valores obtenidos muestran una materia prima con un notable valor proteico, se evidencia también el elevado porcentaje de humedad, sin embargo este es similar al reportado por otros investigadores.

En este sentido, es conveniente destacar el elevado contenido de grasa (5,66%) obtenido en el análisis de la materia prima, el cual es debido principalmente a la incorporación de pescados enteros sin eviscerar, que es una de las razones más importantes ya que las vísceras poseen un elevado contenido graso en proporción al resto del cuerpo del pescado, afectando así el contenido de grasa de los desperdicios trabajados. Esto puede resultar problemático durante el almacenamiento, dado que el producto a elaborar puede sufrir oxidación y a su vez minimizar el valor nutritivo de la proteína.

El valor promedio de pH fue de 6,60; este valor cercano a la neutralidad que no es suficientemente restrictivo para una amplia gama de microorganismos, es similar al reportado por Ottati y Bello 1990, para el pescado molido entero proveniente de la fauna de acompañamiento del camarón adquirida en Puerto Cabello y trasladada al Instituto de Tecnología de Alimentos en las mejores condiciones.

El conteo de aerobios mesófilos fue de 2.5×10^5 UFC/g lo que representa un conteo bajo si se tiene en cuenta que el pescado es molido entero incluyendo piel, branquias e intestinos que son las partes de mayor congregación de bacterias. El conteo de aerobios mesófilos hallado en el pescado, fue del orden de 10^5 UFC/g, el cual se considera aceptable ya que está por debajo de los niveles permisibles para pescado fresco, 1×10^6 UFC/g. según Norma Covenin 902-78.

En tal sentido el hecho de que el conteo de aerobios mesófilos sea del orden de 10^5 que se encuentra dentro del rango de 10^2 UFC/g hasta 10^9 UFC/g, sugiere según Shewan 1997, citado por ICMSF 1980, que existen variaciones muy amplias inherentes tanto a factores ambientales, temperatura y pureza de las aguas (para el caso de la piel y las branquias), así como el estado alimenticio de los peces para el

caso de contajes de bacterias en el intestino. En el contaje de aerobios mesófilos en la fauna acompañante del camarón usado como materia prima para la elaboración de ensilado de pescado por Guevara y col. 1989, Ottati y Bello 1990 y Reyes et al. 1991, reportaron los siguientes contajes de aerobios mesófilos respectivamente 1×10^5 UFC/g, 4×10^4 UFC/g y 6×10^3 UFC/g, reafirmando que estas variaciones en los contajes son inherentes a la zona de captura, manipulación y tipos de especies.

En la Tabla N° 6, se reportan los resultados obtenidos en la caracterización físico-química y microbiológica de la melaza.

Tabla N° 6 Análisis físico, químico y microbiológico de la melaza utilizada en la elaboración de ensilado de pescado.

PARÁMETRO	RESULTADO	NORMA COVENIN
Sólidos totales	$82,76 \pm 0,05$	85 máx
Humedad (%)	$17,24 \pm 0,02$	25 máx
Cenizas (%)	$8,25 \pm 0,05$	8-12
pH	$5,5 \pm 0,18$	5-5,5
°Brix	$82,60 \pm 0,5$	82 mín
Aerobios mesófilos (UFC/g)	$7,2 \times 10^4$	-

Si se compara estos valores con los establecidos por la norma Covenin N° 1980-83 “Alimentos para Animales: Melaza de Caña” se evidencia que la mezcla utilizada cumple con las especificaciones, garantizando así que no se generen daños en el producto debido al uso de materias primas de mala calidad.

IV.3. Establecer las condiciones óptimas de operación para la producción de ensilado de pescado vía microbiana.

Experiencia 1

En la Figura N° 2 se presenta el comportamiento del pH en cada uno de los ensilados.

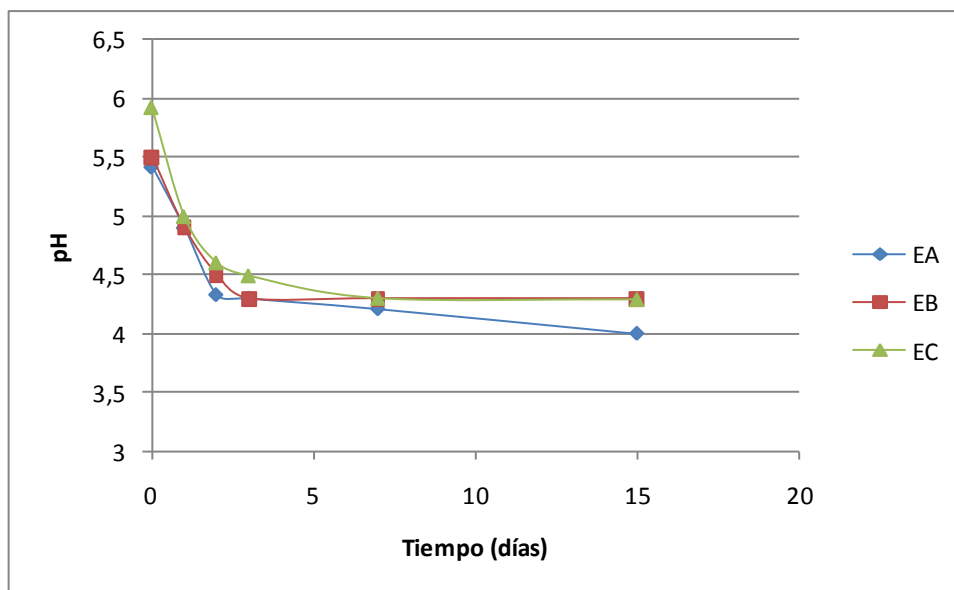


Figura N° 2 Valores de pH en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A; Pescados eviscerados E_B; Músculo de pescado E_C).

Si bien todos los ensilados no inoculados no mostraron señales de deterioro al término del período de evaluación y presentaron la misma tendencia en cuanto al descenso del pH a pesar de que los pH iniciales para cada uno de los ensilados fue distinto, notándose también que el ensilado A alcanzó un pH inferior a 4,5 al cabo de 2 días seguido de los ensilados B y C que alcanzaron esta condición a los 3 días y 7 días respectivamente, es importante resaltar que para que el pH logre disminuir hasta valores por debajo de 4,5 debe esperarse de 2 a 7 días dependiendo del ensilado. Owens y Mendoza, 1985, indican que en la elaboración de ensilado es fundamental una rápida disminución de pH en las primeras horas con el fin de evitar el desarrollo de bacterias patógenas como *Clostridium botulinum* y la producción de toxinas. Este

efecto puede lograrse mediante la adición de un inóculo que promueva la producción de ácido láctico y como consecuencia el descenso del pH.

En la siguiente Figura se evidencia la tendencia de la producción de ácido láctico obtenido para diferentes tiempos de la fermentación.

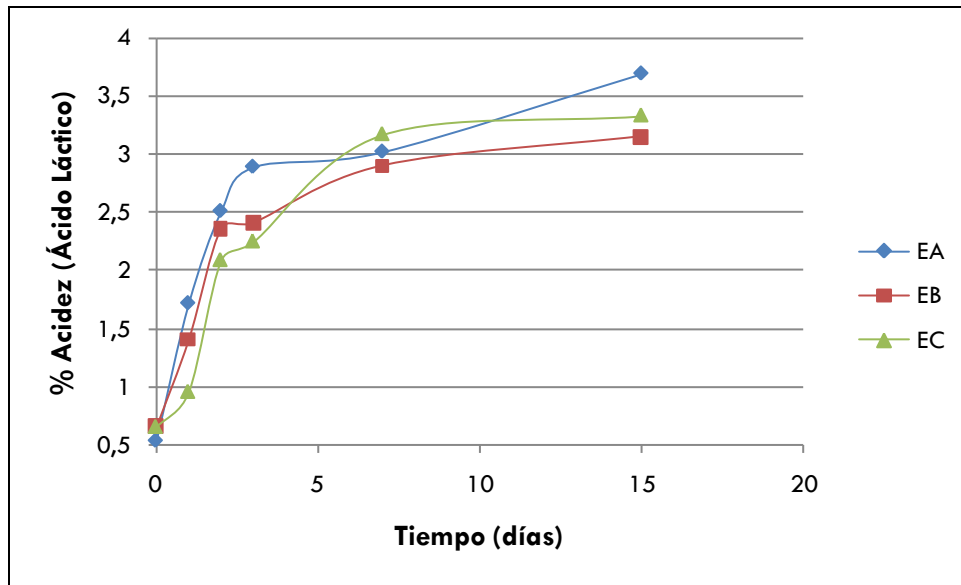


Figura N° 3 Producción de ácido láctico en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

Es necesario resaltar que en estos ensilados no inoculados, la tendencia en cuanto a la producción de ácido láctico fue semejante y que la producción de este ácido dependerá de la flora láctica de la materia prima y de la flora putrefactiva del pescado que, en un ambiente anaeróbico y en presencia de azúcares fermentables, producen ácido generando un ambiente poco propicio para la supervivencia de la flora putrefactiva (Raa y Gildberg 1982). De este modo, la flora que eventualmente produce ácido es variable y explica porqué en ensilados sin inóculo, es mayor el tiempo que tardan en alcanzar valores de pH que aseguren su estabilidad.

Los cambios en los valores de consistencia de los tres ensilados se muestran en la Figura N° 4.

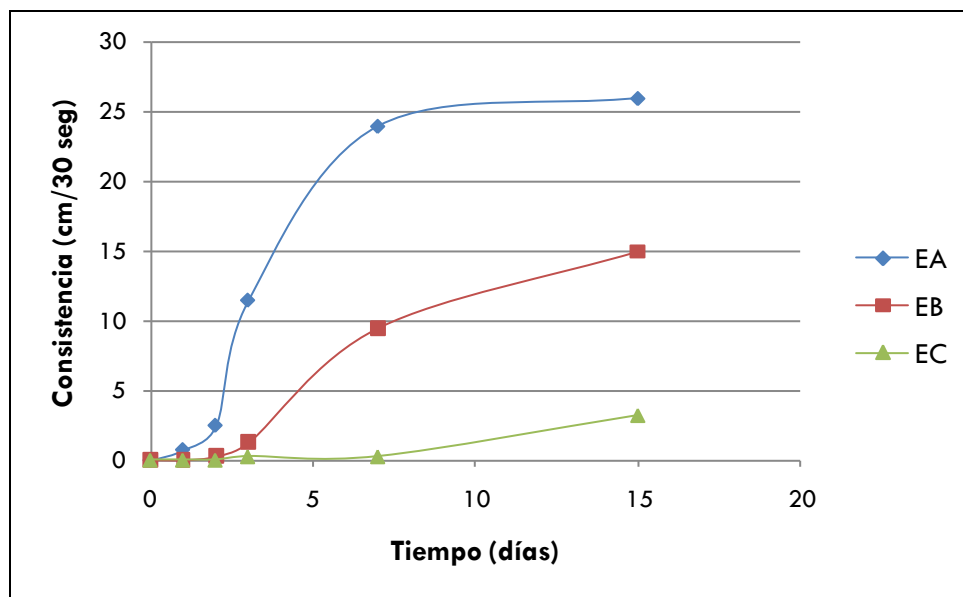


Figura N° 4 Valores de consistencia en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

La menor consistencia en el ensilado A no inoculado implica una mayor actividad de las enzimas viscerales en comparación con la actividad de las enzimas del pescado eviscerado y enzimas musculares presentes en los ensilados B y C respectivamente. Lo expuesto anteriormente se corrobora con los valores de nitrógeno no proteico, reportados en la Tabla N° 7, los cuales evidencian la hidrólisis de las proteínas del pescado.

Tabla N° 7 Valores de nitrógeno no proteico (NNP) en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, sin inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

Tiempo (días)	Nitrógeno no proteico (%N-total)		
	E_A	E_B	E_C
0	14,55 ± 0,30	13,32 ± 0,41	15,15 ± 0,15
7	61,54 ± 0,27	47,84 ± 0,25	40,97 ± 0,21
14	74,57 ± 0,23	51,68 ± 0,40	43,19 ± 0,23

Los resultados de los 3 ensilados reportados en la Tabla N° 7, presentan un incremento progresivo en el transcurso del tiempo. Sin embargo, en el ensilado A la producción de nitrógeno no proteico es mayor, esto debido a la mayor producción de ácido láctico que reduce el pH y favorece por tanto, la actividad proteolítica de las enzimas (tripsina, quimotripsina y pepsina) del pescado.

Huss 1988, señala que a diferencia de la capticina del tejido muscular, la cual puede iniciar la degradación de las proteínas endógenas de la célula a péptidos con actividad óptima a pH 4, las enzimas del tracto intestinal parecen ser bastantes halotolerantes según este investigador. Esto podría justificar la baja actividad proteolítica exhibida por el músculo del pescado (E_C) comparado con la alta actividad proteolítica obtenida al elaborar ensilado con pescados enteros (E_A).

De estos resultados se evidencia que el proceso de hidrólisis no es independiente de la producción de ácido al menos cuando las enzimas de las vísceras están involucradas, si bien otros investigadores como Reyes et al.1991, en investigaciones sobre la optimización del proceso de ensilaje a partir de cataco (*Trachurus lathami*), sardina (*Sardinella anchovial*) y perlita (*Lepohidium profundorum*) concluyeron que la actividad hidrolítica es independiente de la producción de ácido. Es interesante destacar que diferencias en cuanto a las especies utilizadas para la elaboración de ensilado de pescado, pueden influir enormemente sobre los resultados obtenidos. En

relación con este aspecto, Bertullo 1989, señala que la actividad proteolítica varía según la especie.

La falta de correlación entre la acidez y la consistencia de los ensilados B y C, demuestra que la actividad de las captasinas es independiente del pH, Bertullo 1989, señala que estas endo-enzimas musculares muestran un óptimo de actividad proteolítica tanto en condiciones ácidas como alcalinas.

En este sentido, se concluye que el ensilado A elaborado a partir de pescados enteros, permite la hidrólisis de las proteínas del pescado en un menor tiempo, ya que al tener una mayor producción de ácido láctico garantiza un pH inferior a 4,5 en menor tiempo propiciando el medio adecuado para promover una mayor actividad enzimática por parte de las enzimas de las vísceras del pescado. Por lo tanto es el seleccionado para las pruebas de evaluación de la adición de las enzimas y de la influencia de la temperatura en el proceso y de la temperatura de almacenamiento

Experiencia 2

Para conocer el efecto de las bacterias ácido lácticas aportadas por el inóculo, sobre la hidrólisis de las proteínas del pescado así como en la producción de ácido y disminución de pH, se compararon los resultados obtenidos en la experiencia 1 con los obtenidos de los ensilados de pescados elaborados con adición de inóculo.

En la Figura N° 5 se reportan los valores de pH de los diferentes ensilados.

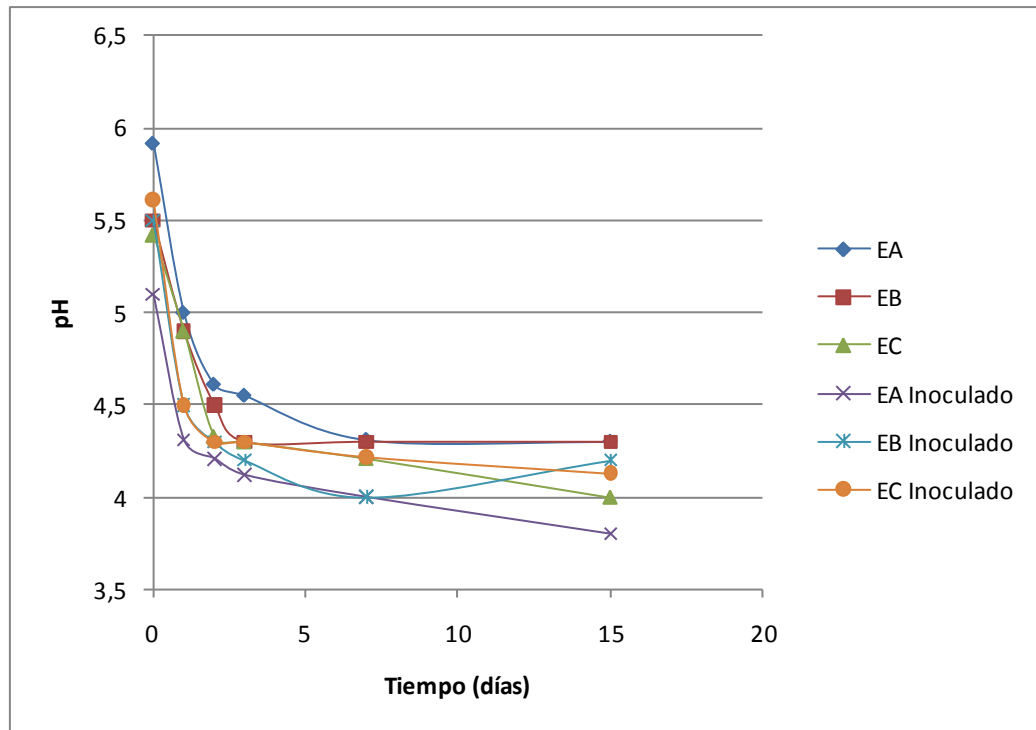


Figura N° 5 Valores de pH en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

En general, en todos ellos se observa que a medida que pasan los días, hay una disminución del pH siendo ésta mayor en el ensilado A, en el caso del ensilado A no inoculado el descenso del pH no fue tan notorio puesto que en el séptimo día de almacenamiento es cuando se alcanzan valores de pH que garantizan la estabilidad del producto ($\text{pH} < 4.5$), en comparación con el pH del ensilado A inoculado el cual alcanza estos valores luego de 24 horas de almacenamiento.

Los ensilados B y C inoculados, alcanzaron un pH inferior a 4,5 a los 2 días de almacenamiento, mientras que los ensilados B y C no inoculados el pH por debajo de 4,5 se alcanzó a los 3 y 2 días de almacenamiento respectivamente, en los 3 sustratos trabajados se evidencia que la incorporación del inóculo reduce el tiempo para alcanzar la condición ácida del medio que garantiza la inhibición de la actividad bacteriana putrefactiva.

En el ensilado B inoculado se evidenció que al final del período de evaluación hubo un incremento en el pH del mismo, este incremento se puede atribuir a una menor producción de ácido láctico en este lapso.

En la siguiente Figura se presenta la tendencia de la producción de ácido láctico en los ensilados.

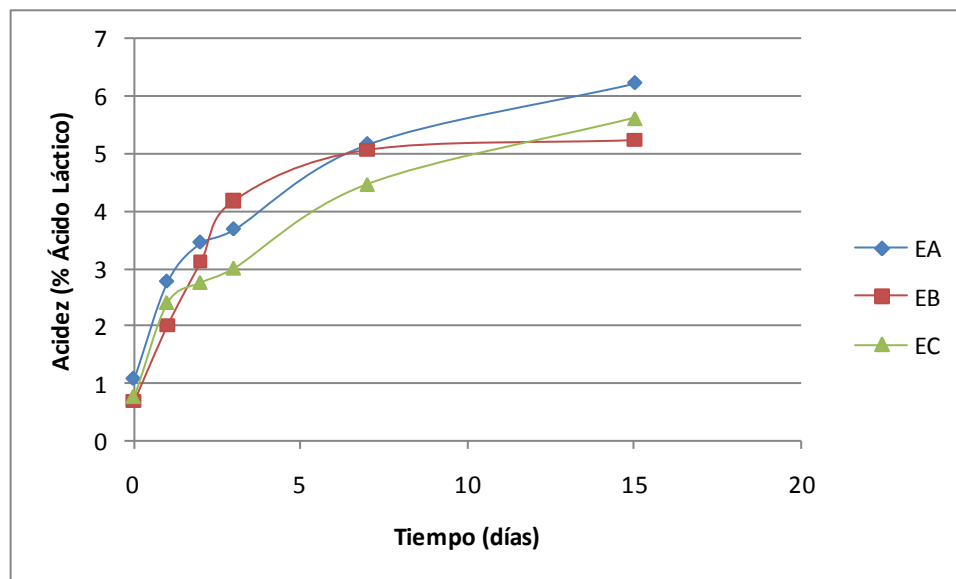


Figura N° 6 Producción de ácido láctico en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

En general, en todos ellos se observa que a medida que pasan los días, hay un aumento en la producción de ácido láctico, siendo ésta mayor en el ensilado A. Esto sugiere que *Lactobacillus bulgaris* se desarrolló más en este ensilado, incrementando así la producción de ácido láctico en el medio y por ende generando un descenso en el pH del mismo, esto se puede inferir a partir de los resultados de recuentos de aerobios mesófilos en la Tabla N° 8.

A continuación se presenta la Tabla N° 8 que contiene el contaje de aerobios mesófilos.

Tabla N° 8 Contaje de aerobios mesófilos en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

Tiempo (días)	Contaje de Aerobios Mesófilos (Log UFC/g)		
	E_A	E_B	E_C
0	6,80	4,70	4,11
7	8,48	6,30	5,78
14	5,90	5,90	5,00

Al comparar la carga inicial de microorganismos encontrada en la mezcla pescado entero-melaza, la misma proviene fundamentalmente de la piel y de las vísceras mientras que al incorporar 1% de inóculo al ensilado la población bacteriana aumentó. De allí que este incremento en el contaje de aerobios mesófilos se atribuye a las bacterias ácido-lácticas inoculadas.

En los tres ensilados se observa un comportamiento similar en cuanto al contaje microbiano que presentó un incremento y posterior disminución de la población microbiana a los 7 y 14 días respectivamente, esta disminución en la población microbiana que se observó al final del almacenamiento, puede deberse al cese del proceso fermentativo, bien sea por el agotamiento de la fuente de carbono, por auto inhibición debida al porcentaje de acidez alcanzada o por control de aerobios mesófilos por los bajos valores de pH.

En la Tabla N° 9 se muestran los valores del nitrógeno no proteico de los tres ensilados durante el período de almacenamiento.

Tabla N° 9 Valores de nitrógeno no proteico (NNP) en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

Tiempo (días)	Nitrógeno No Proteico (% N-total)		
	E_A	E_B	E_C
0	15,76 ± 0,31	13,65 ± 0,20	14,80 ± 0,37
7	67,61 ± 0,26	34,84 ± 0,23	32,39 ± 0,29
14	82,18 ± 0,41	51,78 ± 0,35	46,13 ± 0,27

En primer lugar, se visualiza un marcado aumento en los valores del nitrógeno no proteico de los ensilados en la primera semana de almacenamiento. En segundo lugar, se aprecia una mayor velocidad de hidrólisis de las proteínas del pescado en el ensilado A a las dos semanas de almacenamiento ya que el valor del nitrógeno no proteico experimentó un aumento significativo, de 15,76% en el tiempo cero a 82,22% a los 14 días. Cabe mencionar que los valores iniciales y finales de nitrógeno no proteico hallados en el ensilado A son similares a los reportados por Ottati y Bello 1990 y por Reyes et al. 1991, pese a que estos investigadores elaboraron ensilado a partir de especies de pescados diferentes.

Los mayores cambios en la hidrólisis se evidenciaron en los primeros días, lo cual favorece la obtención del producto final semi líquido en menor tiempo, demostrando así que las condiciones en el medio fueron las necesarias para promover la hidrólisis de las proteínas del pescado. Este hallazgo de una velocidad de hidrólisis mayor en los primeros días de almacenamiento también fue reportado por Backhoff 1976; Raa y Gildberg 1977; Cordova y Bello 1986. Esto también puede ser observado a través de los valores de consistencia presentados en la Figura N° 7.

A continuación se presenta la tendencia de la consistencia en la Figura N° 7 que contiene los valores de consistencia obtenidos para los ensilados.

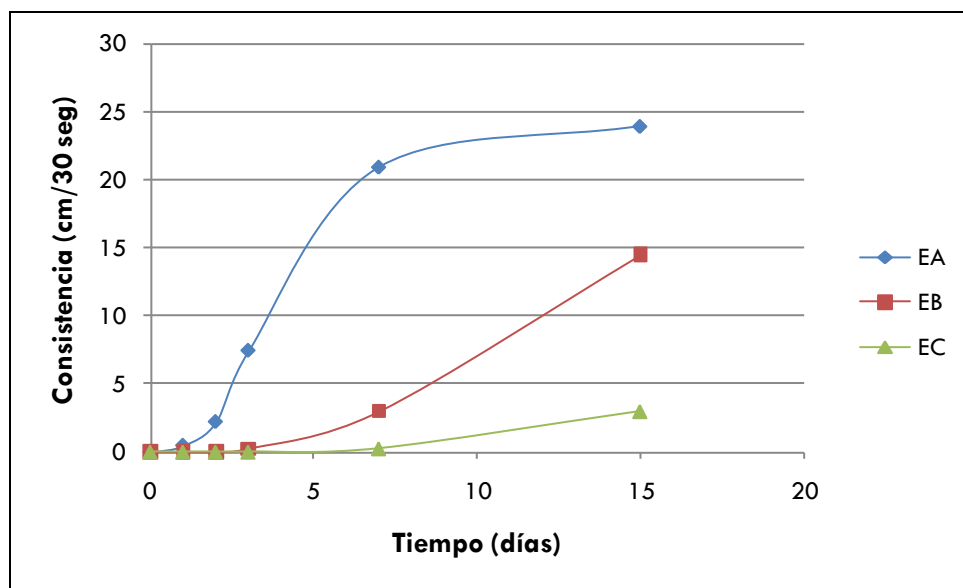


Figura N° 7 Valores de consistencia en ensilados elaborados con una mezcla de pescados, 15% de melaza, 1% de inóculo y almacenados a 30°C (Pescados enteros E_A ; Pescados eviscerados E_B ; Músculo de pescado E_C).

La determinación de la consistencia también es utilizada para estimar el grado de hidrólisis de las proteínas del pescado, este parámetro es medido a través de un consistómetro que permite medir la consistencia de materiales viscosos por medida de la distancia sobre la que el material fluye en una superficie lisa bajo su propio peso durante un intervalo de tiempo dado, de allí que la unidad por la cual es medida es: distancia recorrida por el producto en 30 segundos. El ensilado A mostró mayores valores de consistencia en menor tiempo de almacenamiento.

Los valores de consistencia obtenidos se correlacionan positiva y significativamente con los valores obtenidos para el nitrógeno no proteico en el cual el coeficiente de correlación (r^2) fue igual a 0,2093.

Los ensilados elaborados con pescados eviscerados y con músculo de pescado E_B y E_C respectivamente, no difieren significativamente en los valores de pH y acidez encontrados a lo largo del período de almacenamiento, sin embargo sí experimentan diferencias en cuanto al grado de hidrólisis alcanzado siendo ésta mayor en el ensilado B que en el ensilado C, lo cual sugiere una mayor actividad enzimática en el primero.

De estos resultados se puede concluir que la hidrólisis es causada principalmente por las enzimas de las vísceras y del tracto digestivo, si bien están involucradas las captasinas (Lindgren y Pleje 1983). En tal sentido, Wojtowicz y Odense 1972, han demostrado que las principales proteasas del músculo del pescado, las captasinas tienen una actividad autolítica baja concluyendo que la rápida velocidad autolítica de muchos pescados no es debida a estas enzimas.

De acuerdo con estos resultados se puede concluir que la adición del 1% en peso de inóculo es suficiente para mostrar diferencias en cuanto a la velocidad de producción de ácido y por ende disminución del pH entre ensilados inoculados y no inoculados, indispensable para maximizar la actividad proteolítica de las enzimas viscerales.

Temperatura de Operación

En este sentido se procedió a la elaboración de los ensilados en base al esquema de elaboración que garantizó las condiciones óptimas de operación que generaron un menor tiempo para la hidrólisis del sustrato proteico (E_A , elaborado con pescados enteros y adición de inóculo), estos ensilados se almacenaron a 15 °C, 25 °C, 35 °C, 45 °C y 55°C para poder así determinar la temperatura óptima del proceso.

En la Figura N° 8 se evidencia la tendencia del pH de los diferentes ensilados

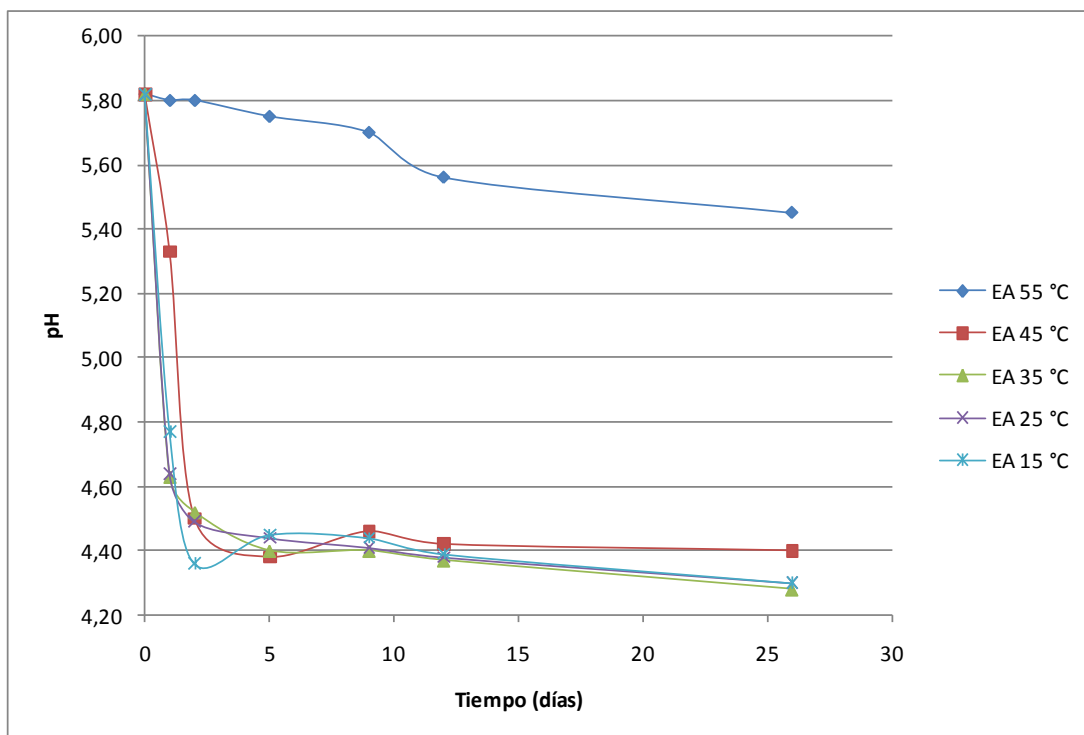


Figura N° 8 Valores de pH en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.

En general, se observa una disminución de pH en todos los ensilados debido a la producción de ácido láctico por parte de los microorganismos. La disminución de pH fue menor en el ensilado a 55 °C, debido a que hubo menor producción de ácido como se evidencia en la Figura N° 9. Esto sugiere que *Lactobacillus bulgaris* no se desarrolla bien a 55 °C.

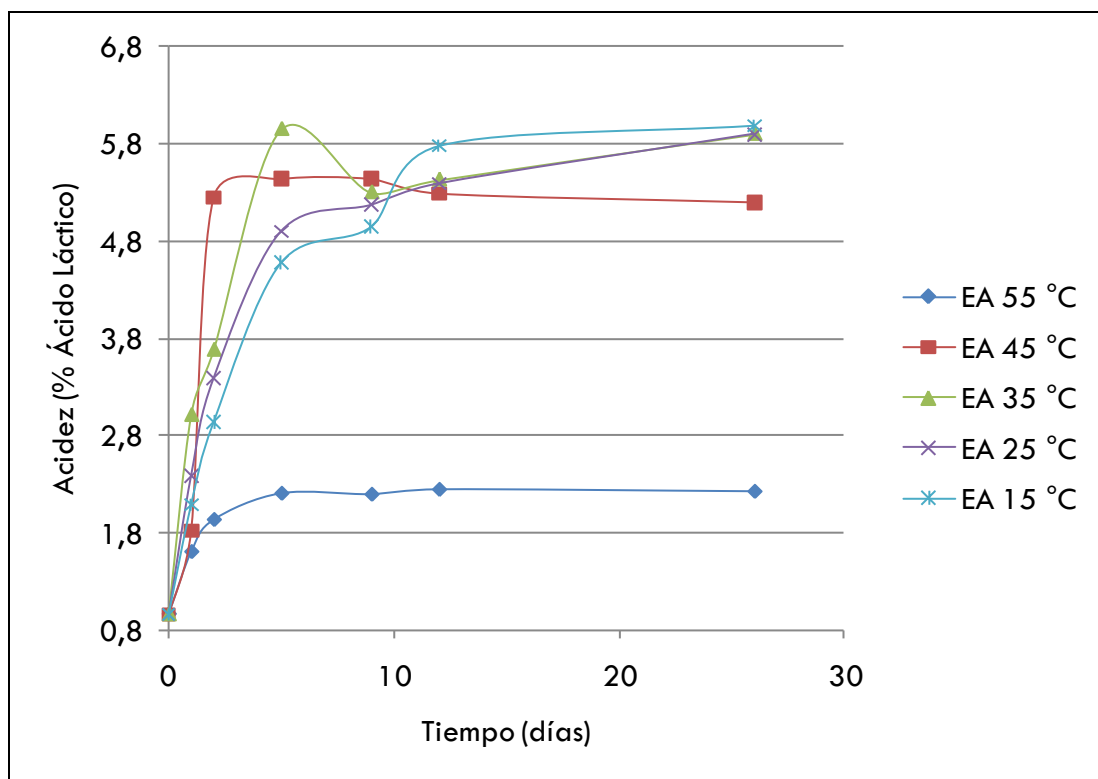


Figura N° 9 Producción de ácido láctico en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.

En cuanto al descenso de pH evidenciado en los ensilados a 15 °C, 25 °C y 35 °C una rápida caída de pH a valores cercanos a 4,5 a las primeras 48 horas, mientras que el ensilado a 45 °C experimentó inicialmente, una menor caída de pH por la escasa producción de ácido como consecuencia del efecto de la temperatura sobre la actividad de las bacterias lácticas. Sin embargo, al cabo de 48 horas presentó mayores valores de acidez y por ende se generó un descenso de pH similar a los alcanzados por los ensilados almacenados a 15 °C, 25 °C y 35 °C, favoreciendo con estas

condiciones la actividad enzimática de las enzimas víscerales, en la Figura N° 9 se puede evidenciar los cambios ocurridos en la producción de ácido láctico.

En la siguiente tabla, se presenta los resultados obtenidos del conteo de aerobios mesófilos.

Tabla N° 10 Cambios en el conteo de aerobios mesófilos en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.

Tiempo (días)	Contaje de Aerobios Mesófilos (Log UFC/g)				
	E_A 55 °C	E_A 45 °C	E_A 35 °C	E_A 25 °C	E_A 15 °C
0	7,95				
7	6,31	7,76	6,87	9,58	9,57
14	3,16	4,11	6,48	8,1	8,11

En esta tabla se evidencia que a temperaturas superiores a 35 °C se ejerce un efecto reductor sobre la población bacteriana generando una disminución en el ácido láctico producido el cual determina el pH del medio que como se ha mencionado anteriormente es necesario que sea inferior a 4,5. Este efecto reductor se hace más notable en la medida que incrementa la temperatura y tiempo de almacenamiento.

En la Figura N° 10 se puede observar los cambios en la consistencia de los ensilados.

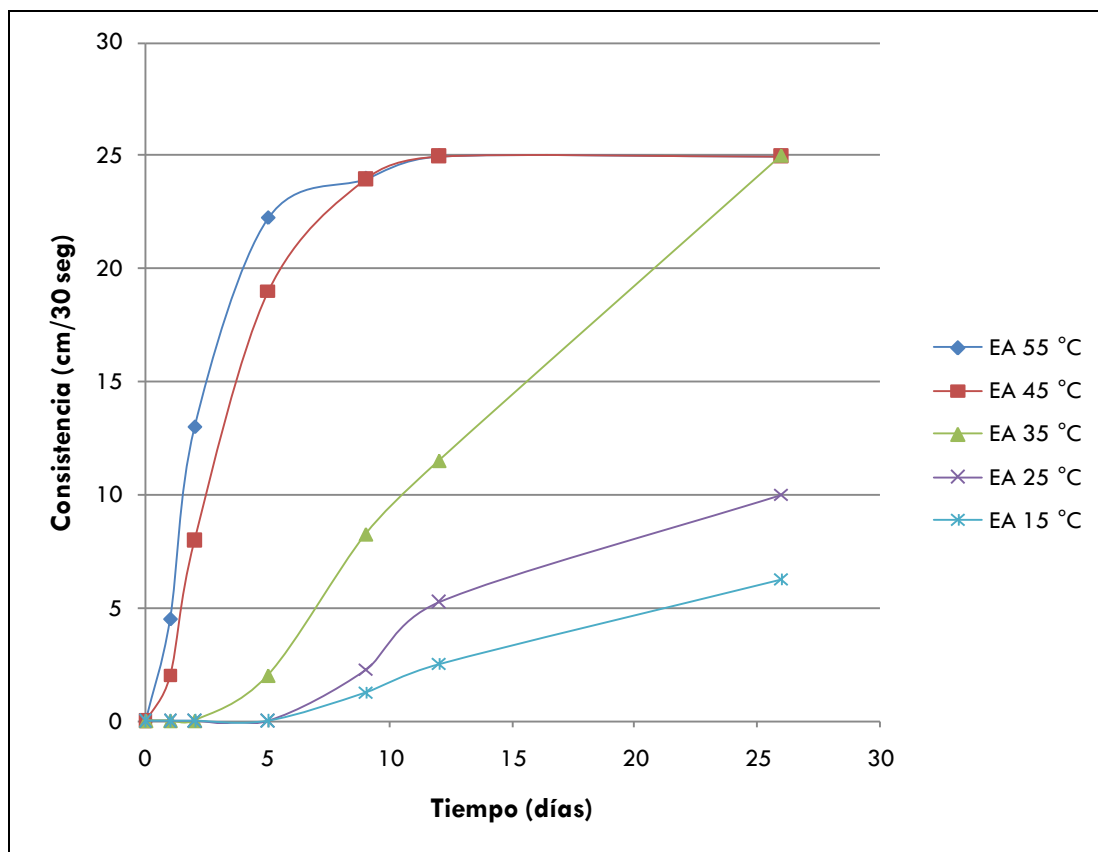


Figura N° 10 Valores de consistencia en ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.

De la Figura N° 10 se desprende que los ensilados sometidos a 35 °C, 45 °C y 55 °C experimentaron un rápido hidrólisis en comparación a los sometidos a temperaturas inferiores. Cabe destacar que el ensilado a 55 °C exhibió mayor hidrólisis en menor tiempo, lo cual se debe a que la velocidad se incrementa con la temperatura; es decir, las enzimas proteolíticas del pescado encargadas de degradar las proteínas a péptidos y aminoácidos solubles, incrementan su actividad en la medida que aumenta la temperatura (Raa y Gildberg, 1982).

Durante el período de evaluación se procedió a evaluar cualitativamente la consistencia de los ensilados así como la apariencia de los mismos, los resultados se presentan en la Tabla N° 11.

El grado de hidrólisis estimado visualmente se correlaciona con los valores de consistencia hallados en la Figura N° 9. En la Tabla N° 11 también se evidencia que los ensilados a temperaturas menores a 35 °C presentaron fuertes olores ácidos a partir de los 6 días, lo cual se corresponde a la acidez alcanzada en este período. El color marrón oscuro se debe a la incorporación de melaza.

Tabla N° 11 Cambios en la características organolépticas de los ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas.

Tiempo Días	Características Organolépticas				
	E_A 55 °C	E_A 45 °C	E_A 35 °C	E_A 25 °C	E_A 15 °C
0	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa
2	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: semilíquida	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: melaza Color: marrón Consistencia: pastosa
6	Olor: melaza quemada Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: melaza - ácido Color: marrón Consistencia: semilíquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: semilíquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: pastosa

Continúa

Tabla N°11 Cambios en la características organolépticas de los ensilados elaborados a partir de pescados enteros o restos de pescado que contienen vísceras almacenados a diferentes temperaturas. (Continuación)

Tiempo Días	Características Organolépticas				
	E_A 55 °C	E_A 45 °C	E_A 35 °C	E_A 25 °C	E_A 15 °C
12	Olor: melaza quemada Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: pastosa	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: pastosa
20	Olor: melaza quemada Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: líquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: semilíquida	Olor: ácido Color: marrón Consistencia: semilíquida

Concluyendo de esta forma que la temperatura óptima de operación es 35°C ya que a esta temperatura se ejerce un efecto notable sobre el crecimiento de los microorganismos ácido-lácticos que se ve reflejado en la producción de ácido láctico y por ende en la disminución del pH, propiciando la condición ácida necesaria promotora de la actividad enzimática en el pescado.

IV.4. Evaluar la adición de una enzima proteolítica en la producción de ensilado de pescado vía microbiana.

Ensayos Preliminares.-

Actividad Caseinolítica de la Bromelina y de la Papaína.

Antes de proceder a determinar la actividad de las preparaciones comerciales de las enzimas bromelina y papaína sobre las proteínas de la carne del pescado, se estudió el comportamiento de estas sobre la caseína a los valores de pH considerados óptimos sobre este sustrato (pH 7,2 para la bromelina y pH 8,0 para la papaína; según método descrito por Kunitz 1947 y modificado por Amoon y Shapira 1967), en el caso de la papaína se empleó 10 mg de sustrato mientras que para la bromelina se empleó 30 mg.

En la Figura N° 11 se muestran los resultados obtenidos en función a la absorbancia, ya que la actividad enzimática se evalúa mediante ensayos espectrofotométricos, dado que el producto de la actividad enzimática absorbe luz a una longitud de onda determinada (280nm), permitiendo así evaluar la aparición del mismo midiendo el incremento de absorbancia a dicha longitud de onda.

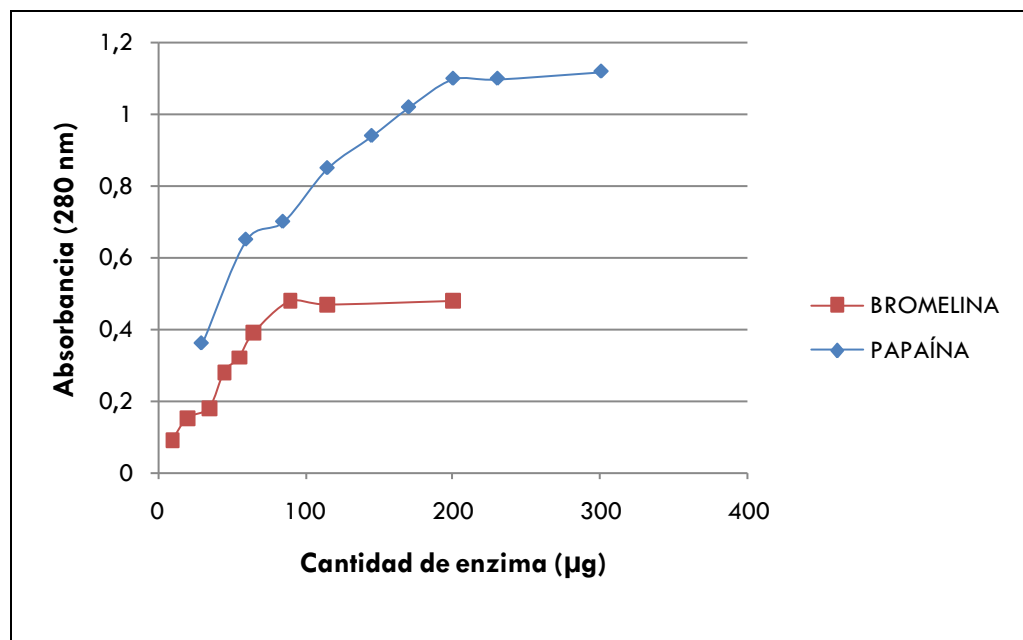


Figura N° 11 Actividad de preparaciones comerciales de papaína y bromelina sobre la caseína a pH 8.0 y pH 7.2 respectivamente.

En la actividad hidrolítica de ambas proteasas, el aumento progresivo de la velocidad de la reacción se debe al aumento progresivo de la cantidad de enlaces peptídicos rotos por unidad de tiempo. La velocidad se mantiene constante en el momento en el cual la cantidad de enlaces peptídicos disponibles a la enzima obligan a una situación en la que el sustrato se convierte en un factor limitante para la reacción, pese a que se aumente significativamente la cantidad de enzima en el medio.

En función a los resultados obtenidos la enzima que se adicionará al ensilado será la bromelina.

Actividad Proteolítica de las preparaciones comerciales de bromelina y de papaína sobre las proteínas del pescado.

Efecto de la Concentración de bromelina y de papaína sobre la actividad enzimática.

En la Figura N° 12 se muestran los valores de absorbancia obtenidos para ambas preparaciones cuando se emplea como sustrato proteínas de la carne del pescado. Todas las determinaciones se realizaron a la temperatura de 35°C, con un tiempo de incubación de 20 min y a pH 8,0 para la medición de la actividad con papaína y 7,2 con bromelina.

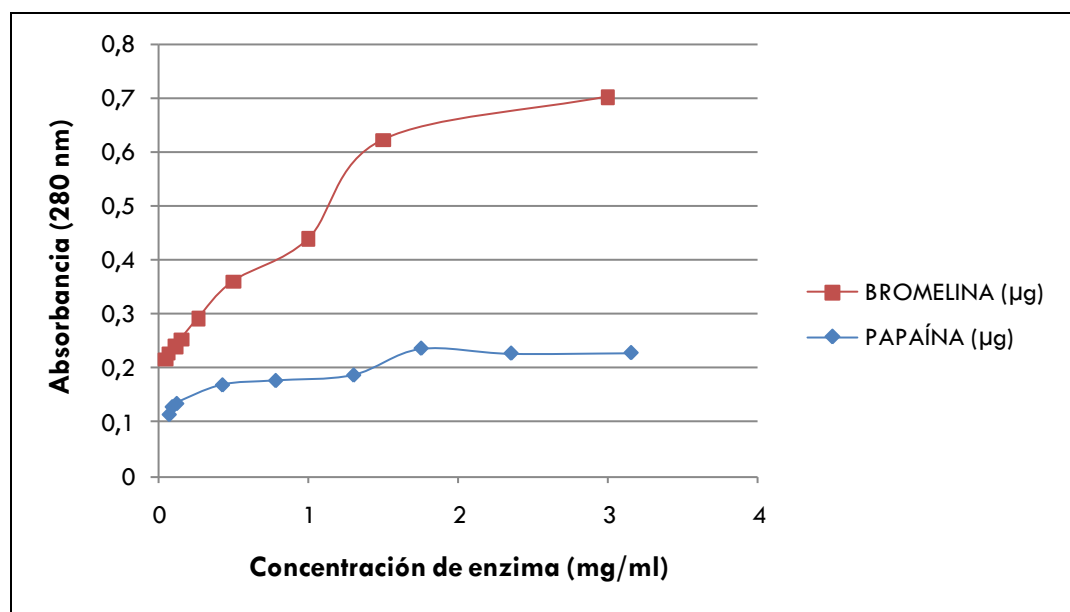


Figura N° 12 Actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de papaína y bromelina sobre las proteínas de la carne del pescado a pH 8.0 y 7.2 respectivamente.

Los resultados obtenidos presentan un aumento progresivo en la actividad de ambas enzimas a medida que aumenta la concentración de enzimas en el sistema. En la

Figura N° 12 se aprecia además que la actividad proteolítica de la preparación de bromelina duplica y hasta triplica la obtenida con papaína.

En el comportamiento de la papaína, se evidencia que en concentraciones inferiores a 1,5 mg/ml la velocidad de reacción se mantiene constante.

En este sentido, el hecho de que la bromelina es la que posee menos unidades de actividad por μg de proteína en comparación con la papaína, confirma su superioridad proteolítica sobre este sustrato como se evidencia en la Figura N° 12.

Es posible que aún cuando se haya alcanzado una velocidad constante de la reacción enzimática sigan existiendo enlaces peptídicos que, de ser rotos, aumentarían el rendimiento logrado por la proteólisis pero, existe el factor de la especificidad enzimática ante el sustrato que es la limitación del proceso de hidrólisis, pues es sabido que no se conoce ninguna enzima que sea capaz de hidrolizar todos los tipos de enlaces peptídicos; para lograr esto sería necesario emplear mezclas de enzimas con diferentes especificaciones (Hill 1965), es decir, para mejorar el rendimiento de la papaína sería necesario entonces evaluar la adición de otra enzima proteolítica.

Trabajos realizados por Beddows et al 1976, en la elaboración de salsa de pescado a partir de un homogeneizado de macarela (*Rastrelliger canaqrta*) muestran que la bromelina aumentó la velocidad y extensión de la proteólisis. Medidas del grado de hidrólisis y de la conversión de los compuestos nitrogenados insolubles a solubles, después de 14 días de incubación a 38°C, mostraron que el grado más alto de hidrólisis fue obtenido con la adición de 0.2% de bromelina.

Baixeras 1982, elaboró hidrolizados proteicos a partir de pepitona (*Arca zebra*) utilizando papaína y bromelina. El hidrolizado obtenido con bromelina presentó ventajas sobre el elaborado con papaína en función de los valores de la calidad biológica, del rendimiento del producto elaborado y del nitrógeno soluble. En los resultados se evidenció que la bromelina es más eficiente que la papaína en la solubilización del nitrógeno de las proteínas y rinde aproximadamente 15% más de

nitrógeno que la papaína en cada intervalo de tiempo y al cabo de 24 horas de digestión supera a la papaína en más de un 25% de nitrógeno en el sobrenadante aproximadamente.

Hay que destacar que estos resultados son contrarios a los obtenidos cuando se empleó caseína para medir la actividad de ambas preparaciones, lo cual confirma que realmente la actividad de una enzima sobre un sustrato en particular no es independiente de la naturaleza del mismo de acuerdo con Hill 1965, que reporta que no se conoce ninguna enzima que sea capaz de hidrolizar todos los tipos de enlaces peptídicos.

Efecto del pH sobre la actividad enzimática.

Las condiciones del medio juegan un papel muy importante en la actividad de una enzima, pues influyen directamente sobre varias de las características químicas de la molécula de enzima y de la molécula de sustrato (Lehninger 1976). A este respecto, Reed 1975, menciona que es probable que las diferencias que muestra una enzima en su actividad por la variación de las condiciones de pH del medio, sean debidas a los cambios ocurridos en la ionización de la molécula de la enzima, del sustrato, o del complejo enzima-sustrato.

Sin embargo, en la célula, la actividad de una enzima ante el pH está también influenciada por el efecto que tenga el pH sobre las demás enzimas de esa célula, obteniéndose respuestas posiblemente diferentes, cada una, ante estas condiciones químicas específicas. Así la respuesta observada será el resultado global de la actividad de todas esas enzimas frente a ese determinado valor de pH (Lehninger 1976) y este es el motivo por el cual una misma enzima presenta diferentes respuestas de actividad ante distintos tipos de sustratos.

La respuesta de la actividad enzimática de la papaína a las variaciones del pH, sobre las proteínas del pescado, se presentan en la Figura N° 13.

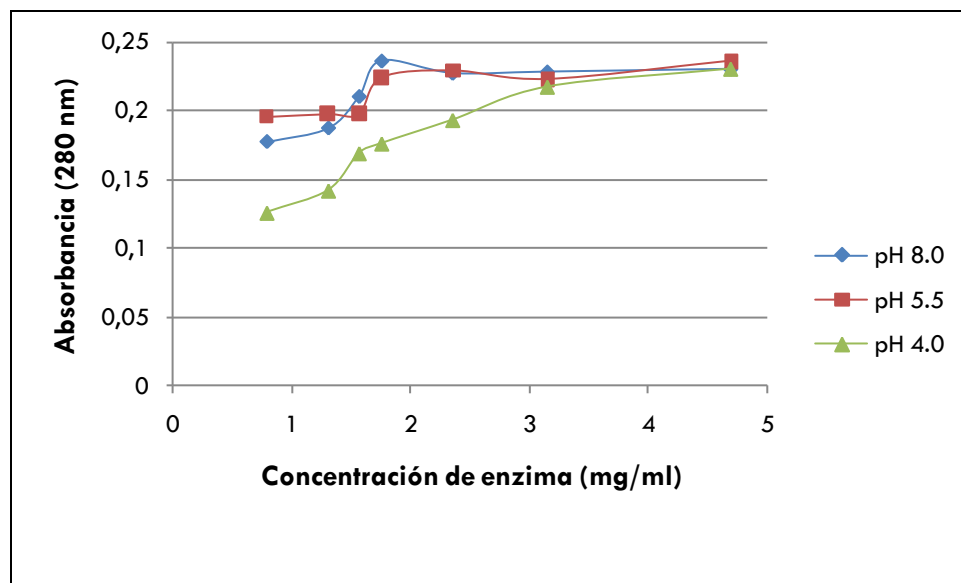


Figura N° 13 Actividad proteolítica de una preparación comercial de papaína sobre las proteínas de la carne de pescado a tres valores de pH.

En este ensayo se trabajó con 30 μ g de proteína, un tiempo de incubación igual a 20 minutos y una temperatura de incubación de 35 °C. Se puede apreciar que su actividad es mayor a pH 8,0 y pH 5,5 que a pH 4,0. Si se compara su actividad con los dos primeros valores de pH se puede concluir que es prácticamente independiente del pH cuando es estudiada en ese rango.

A pH 4,0 su actividad se ve afectada cuando se usa una concentración baja de proteína, pero cuando ésta aumenta, la actividad enzimática se recupera alcanzando valores deseables.

Sen et al 1962, reportaron que se logró una mayor recuperación de nitrógeno total cuando la hidrólisis de la proteína del pescado (*Rastrelliger canaqurta*) se llevó a cabo con papaína a un pH de 7.0 lo cual coincide con los resultados obtenidos por Baixeras 1982, con pepitonas, sin embargo, estos autores consideran el óptimo a un nivel de pH 5,0 y que se logró un mayor fraccionamiento molecular de la proteína. Ellos han atribuido sus resultados al hecho de que hay una mayor hidratación del medio a pH 7,0 que a pH 5,0, ya que a este último valor las proteínas del músculo están más cerca del punto isoeléctrico. Un valor de pH de 7,0 favorece una mayor distribución y

mejor contacto de la molécula de enzima con la del sustrato, ya que las proteínas muestran un mínimo grado de hidratación cuando se encuentran en su punto isoeléctrico (Borgstrom 1962). También Hale 1969, ajustó las condiciones de pH a 7,0 en sus estudios de hidrólisis con esta enzima. Igualmente, Das et al. 1979, obtuvieron resultados similares con la utilización de papaína en la hidrólisis enzimática de un concentrado proteico de pescado, estos autores reportan un rendimiento ligeramente superior de esta enzima a valores de pH comprendidos entre 6,0 y 7,0.

Lida et al 1973, señalaron que la papaína cruda es inestable a pH 2,5 y a pH superior a 12, mientras que la enzima cristalina es muy estable a pH 10,5 e inactivada por debajo de 4,5; coincidiendo así con el rango de pH óptimo determinado en este trabajo para esta enzima, el cual se encuentra entre 5,5 y 8,5.

A continuación se presentan los valores obtenidos para la bromelina.

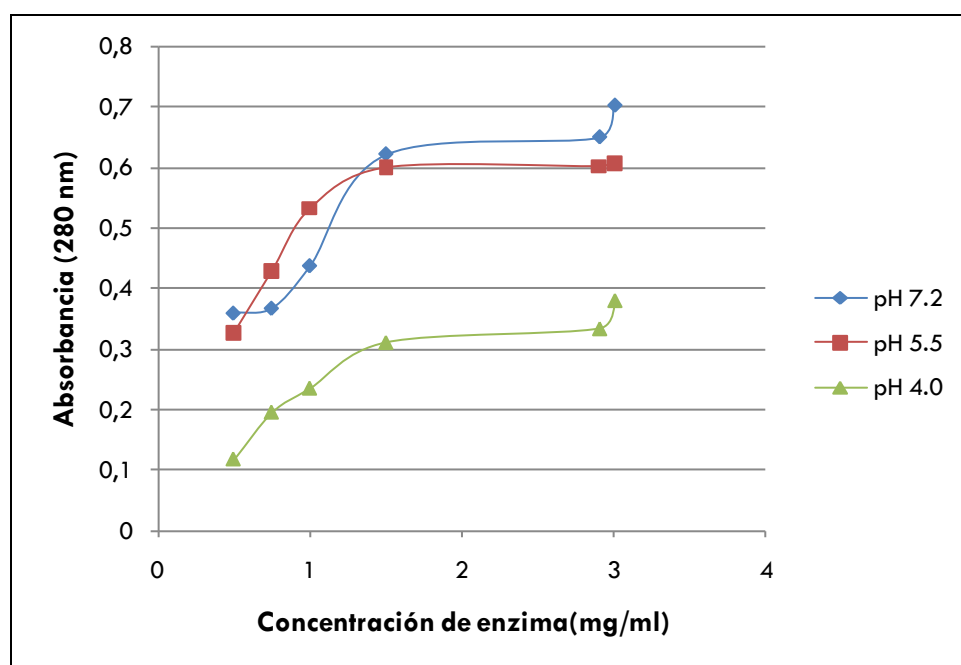


Figura N° 14 Actividad proteolítica de una preparación comercial de bromelina sobre las proteínas de la carne de pescado a tres valores de pH.

Se puede notar que su mayor actividad se presenta a dos valores de pH: 5,5 y 7,2; concluyéndose que la actividad de esta enzima es prácticamente independiente del pH cuando es estudiada a dichos valores. Significa entonces que la bromelina presenta su óptimo de pH en el rango comprendido entre 5,5 y 7,2 cuando se emplea en la mezcla de pescados para ensayar su actividad proteolítica, de acuerdo con Baixeras 1972, que en sus estudios de hidrolizados proteicos a partir de la pepitona, señala que la bromelina presenta un comportamiento casi constante en su actividad en un rango de pH de 6,0 hasta 8,5. En este sentido Ottati et al. 1961, reportan diferentes valores óptimos de pH para la bromelina según sea el sustrato utilizado, obteniéndose valores de actividad en un rango comprendido entre 4 y 9 con sustratos como caseína y hemoglobina. Igualmente, Hale 1969, informó que las casas distribuidoras de esta enzima reportan el mismo rango óptimo de pH.

Al comparar las actividades enzimáticas de ambas preparaciones a los tres valores de pH (Figura N° 13 y Figura N° 14), se evidencia la superioridad de la bromelina sobre la papaína. El hecho que la bromelina presente una elevada actividad a un valor ácido de pH (5,5) la hace ideal para ser incorporada en el proceso de obtención del ensilado microbiano de pescado de acuerdo con varios investigadores que han reportado que hidrolizados proteínicos elaborados con esta enzima poseen generalmente un buen valor nutritivo y no presentan problemas de toxicidad como consecuencia de la actividad enzimática (INSTITUTO DE FOMENTO PESQUERO DE CHILE 1971; Ballester et al. 1977).

Es interesante destacar que si bien estos ensayos fueron realizados a una temperatura de 35°C, los valores de temperatura reportados como óptimos para ambas enzimas actuando sobre un sustrato de pescado no se alejan mucho de ésta, de acuerdo con Sen et al 1962, que reportaron que la papaína rinde la mayor recuperación de nitrógeno en la hidrólisis de las proteínas de pescado a 40°C mientras que Beddows et al 1976, consideraron una temperatura de 38°C como la más deseable en la elaboración de una salsa de pescado utilizando bromelina para la proteólisis.

Efecto del Tiempo sobre la Actividad Enzimática de la Bromelina.

Una vez establecida la superioridad de la bromelina sobre la papaína en la hidrólisis de las proteínas del pescado, se procedió a estudiar el efecto del tiempo sobre su actividad enzimática a los valores de pH y concentración de enzima establecidos como óptimos en los ensayos anteriores. Los resultados de la actividad hidrolítica de la bromelina sobre las proteínas de la carne del pescado, se muestran en la Figura N° 15.

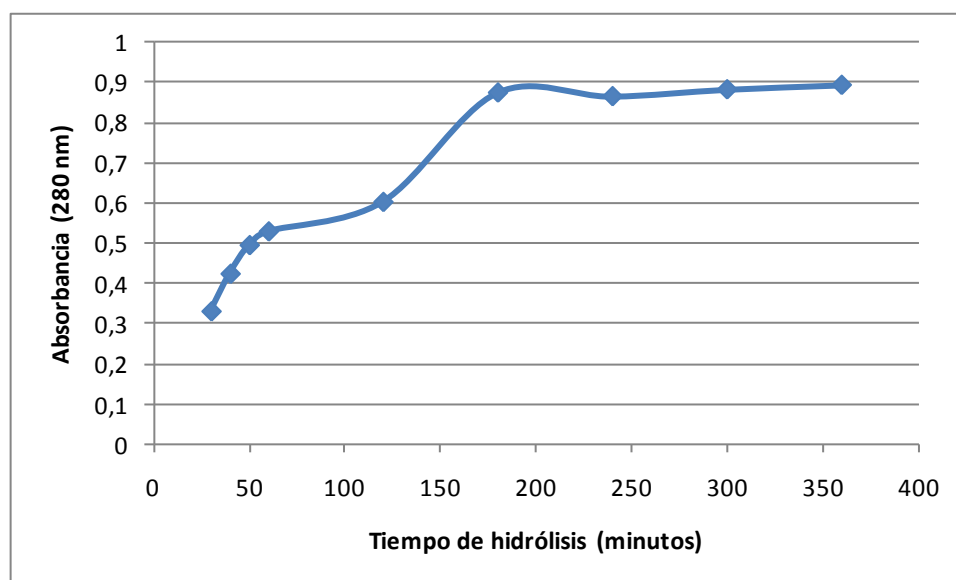


Figura N° 15 Efecto del tiempo de inoculación sobre la actividad proteolítica de la bromelina a pH 5.5

Esta evaluación se realizó empleando 30 μg de proteína, 5% (peso de proteína/100 g de carne del pescado) de bromelina a un pH igual a 5,5 y temperatura de incubación igual a 35 °C. Se puede notar el aumento en la absorbancia a 280 nm a medida que aumente el tiempo de incubación de la reacción. La evidencia más importante es que la mayor actividad de la enzima se obtiene durante los primeros 180 minutos de hidrólisis; después los productos de la reacción permanecen más o menos constantes hasta las 6 horas de incubación que duró el ensayo.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Bhumiratana et al 1977, quienes consideran que la marcada disminución en la velocidad de la proteólisis a medida que transcurre el tiempo puede ser atribuida a uno o más de los siguientes factores actuando en conjunto: a) la aproximación al estado de equilibrio en la reacción hidrolítica; b) la formación de productos inhibidores y c) la desactivación enzimática por la vía de la autólisis, siendo más importantes los dos primeros factores.

Experiencia 3

Durante la hidrólisis, se siguieron realizando determinaciones de: nitrógeno no proteico y consistencia a las 0 horas, 3 horas, 12 horas y 24 horas, a fin de evaluar el efecto de la concentración de la enzima en la hidrólisis, los ensilados fueron elaborados a partir de pescados enteros con la adición de 1% en peso de inóculo, difiriendo entre ellos en la concentración de enzima añadida, y para el caso del ensilado control, éste se realizó sin la adición de la enzima. Los resultados se muestran en la Tabla N° 12 y Figura N° 16, respectivamente.

Tabla N° 12 Valores de nitrógeno no proteico en ensilados elaborados con mezclas de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo y concentraciones variables de bromelina.

TIEMPO (horas)	VALORES DE NITRÓGENO NO PROTEICO (% N-total)				
	E₁ (0.9%)	E₂ (0.7%)	E₃ (0.45%)	E₄ (0.2%)	E_C (control)
0	35,47 ± 0,18	26,33 ± 0,09	27,34 ± 0,16	20,46 ± 0,15	13,30 ± 0,11
3	78,46 ± 0,18	72,93 ± 0,13	73,49 ± 0,23	61,53 ± 0,11	13,90 ± 0,21
12	82,55 ± 0,23	87,68 ± 0,13	76,44 ± 0,06	67,43 ± 0,09	22,63 ± 0,26
24	87,31 ± 0,21	91,38 ± 0,07	78,88 ± 0,12	69,49 ± 0,13	32,87 ± 0,17

En lo que respecta al nitrógeno no proteico, se puede notar un aumento en el contenido de nitrógeno no proteico, en todos los ensilados, a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento del ensilado. La mayor velocidad de conversión proteica se observa en el ensilado 2 (E₂) mientras que la menor se presenta en el ensilado control (E_C).

En todos los ensilados, exceptuando el ensilado control, el mayor grado de proteólisis se observa en las tres primeras horas de almacenamiento, después sólo ocurren ligeros aumentos en los valores de nitrógeno. Este comportamiento se puede corroborar con los resultados obtenidos en la determinación de consistencia que se presenta en la Figura N° 16.

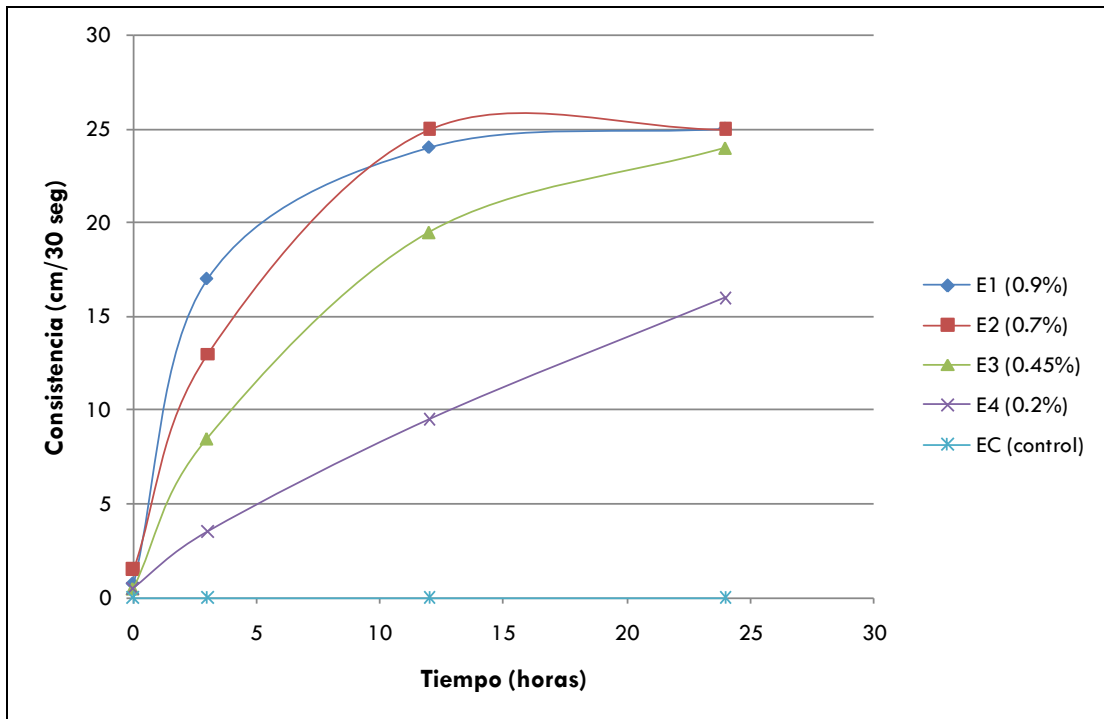


Figura N° 16 Valores de consistencia en ensilados elaborados con mezclas de pescado, 15% de melaza, 1% de inóculo y concentraciones variables de bromelina.

El ensilado E₁, que contiene 0,9% de bromelina y el ensilado E₂, con 0,7% de bromelina, tuvieron grados de hidrólisis similares y de acuerdo con los valores de consistencia mostrados en la Figura N° 16, alcanzaron hidrólisis máxima en el mismo tiempo (12 horas). Los ensilados E₃ y E₄ sufrieron hidrólisis más lentamente que los ensilados anteriores alcanzando ambos la hidrólisis máxima a las 24 horas de almacenamiento, también se nota que el ensilado E_C no sufrió ningún cambio en este período de evaluación.

Los resultados de nitrógeno no proteico obtenidos en el caso del ensilado E_C indican la existencia de actividad proteolítica por las enzimas naturales presentes en el pescado, este detalle no se observó en los ensayos bioquímicos, probablemente por los daños causados a estas enzimas durante los tratamientos de liofilización, homogeneización, centrifugación y diálisis a los que fueron sometidas las muestras.

Estos resultados evidencian que existe una marcada superioridad en la proteólisis cuando se utilizan enzimas comerciales en comparación con la hidrólisis de las enzimas nativas, lo que pone de manifiesto la importancia que tiene el empleo de la bromelina en este proceso de hidrólisis.

De esta experiencia se concluye que la adición de 0,7% p/p favorece notablemente el proceso de hidrólisis del sustrato proteico.

IV.5. Caracterizar mediante métodos físico-químicos y microbiológicos el producto final con el fin de determinar la calidad del mismo.

En base a los resultados obtenidos anteriormente, se determinó en función del tiempo requerido para la hidrólisis del sustrato proteico, el efecto que puede ocasionar la presencia de enzimas en el alimento para animales y al costo que generará la adición de insumos, que el ensilado que se ajusta mejor a estos tres parámetros es el ensilado obtenido usando un inóculo a partir de pescados enteros o con restos de vísceras (E_A,

experiencia 2), almacenado a temperatura ambiente igual a (30 ± 2) °C. De allí que se procede a reportar los valores obtenidos de la caracterización físico-química y microbiológica al inicio y final del período de almacenamiento para este ensilado.

En la Tabla N° 13 se muestran los resultados de la composición del ensilado de pescado obtenido por vía microbiana tanto al inicio como al final del período de almacenamiento.

Tabla N° 13 Análisis físico-químico y microbiológico del ensilado de pescado al inicio y al final del período de almacenamiento a 30°C.

PARÁMETRO	INICIAL (t=0 días)	FINAL (t=14 días)
HUMEDAD (%)	69,56 ± 0,15	67,25 ± 0,21
PROTEÍNA CRUDA (%)	15,98 ± 0,08	16,27 ± 0,10
GRASA (%)	4,70 ± 0,18	5,04 ± 0,09
CENIZAS (%)	0,96 ± 0,03	1,21 ± 0,01
CARBOHIDRATOS (%)	8,80 ± 0,24	10,23 ± 0,013
NNP (%N-Total)	15,76 ± 0,33	82,18 ± 0,026
PH	5,1 ± 0,01	3,8 ± 0,03
AEROBIOS MESÓFILOS (UFC/g)	3,5 10 ⁵	3,5 10 ⁵
MOHOS (UFC/g)	4,6. 10	4,6. 10
LEVADURAS (UFC/g)	6,3 .10	6,3 .10
<i>E. COLI</i> (NMP/g)	4	3
<i>SALMONELLA</i>	Negativo	Negativo

(UFC: unidades formadoras de colonias, NMP: número más probable)

En primer lugar un hecho resaltante es que los valores obtenidos para todas las determinaciones no difieren significativamente de los valores obtenidos para la materia prima utilizada. Las diferencias existentes son producto del procesamiento al cual fue sometido el pescado molido, esto se evidencia en el contenido de cenizas y de carbohidratos, ya que, en el ensilado hay un 9,52% de carbohidratos inherente a la incorporación de la melaza y un mayor contenido de cenizas consecuencia también de la incorporación de melaza.

En segundo lugar, no se observaron diferencias marcadas en los resultados mostrados en la Tabla N° 13, obtenidos para las diferentes determinaciones realizadas tanto al inicio como al final del almacenamiento del producto, concluyéndose que no existen diferencias inherentes al proceso de hidrólisis. El alto porcentaje de proteínas que posee el producto (16,13%) lo hace sumamente atractivo para la suplementación de dietas para animales, resultados muy similares fueron reportados por Guevara et al., 1998. Se evidenció también que debido a su elevado contenido de agua (68,41%) su comercialización debe ser en forma líquida.

En cuanto al pH, éste disminuye durante los 15 días de almacenamiento debido al aumento de ácido durante la fermentación.

El incremento en el porcentaje de grasa al final del período de evaluación, se atribuye a que en el tiempo cero no se homogenizó suficientemente la mezcla.

Los valores de nitrógeno no proteico en el ensilado almacenado aumentaron significativamente con respecto al valor de 15.76% hallado a tiempo cero. Esto evidencia un incremento en la actividad enzimática por lo cual un gran número de compuestos tales como aminoácidos, péptidos, amonio y aminos se están formando, incrementando así el grado de hidrólisis del producto, estos resultados son más satisfactorios que los obtenidos por Córdova (1986) y Rodríguez (1987), quienes realizaron caracterizaciones de ensilados de pescados, encontrándose diferencias en los resultados, las cuales pueden ser atribuidas tanto a la metodología empleada en la

elaboración de los mismos como a las especies magras y grasas constituyentes de los diferentes lotes utilizados por estos investigadores.

IV.6. Determinar la temperatura óptima para el almacenamiento del producto terminado.

Una vez optimizados los parámetros que controlan la producción de ensilado microbiano de pescado, se procedió a evaluar el efecto que tiene sobre el producto final la temperatura de almacenamiento de los mismos por un tiempo igual 90 días a fin de evaluar la estabilidad del mismo. Se prepararon los ensilados usando un inóculo como se reporta en la experiencia 2 a partir de pescados enteros (E_A) a una temperatura de 35 °C, al cabo de 14 días estos fueron almacenados a temperatura ambiente 30 °C y a 45 °C, la primera temperatura por ser la temperatura ambiente promedio y la última debido a que la empresa dispone esta área para a la incubación de los productos terminados.

Para el control de la estabilidad del producto final a estas condiciones de temperatura, se llevó el control de los siguientes parámetros: pH, acidez titulable, contaje de bacterias ácido-lácticas, nitrógeno no proteico, consistencia.

En la Figura N° 17 se muestran las variaciones de pH a través del tiempo, en los ensilados almacenados a 30 °C y a 45 °C, comparando ambos ensilados, se nota el efecto de la temperatura sobre la disminución del pH. El ensilado almacenado a 30 °C presentó una caída más rápida del pH que el ensilado a 45 °C.

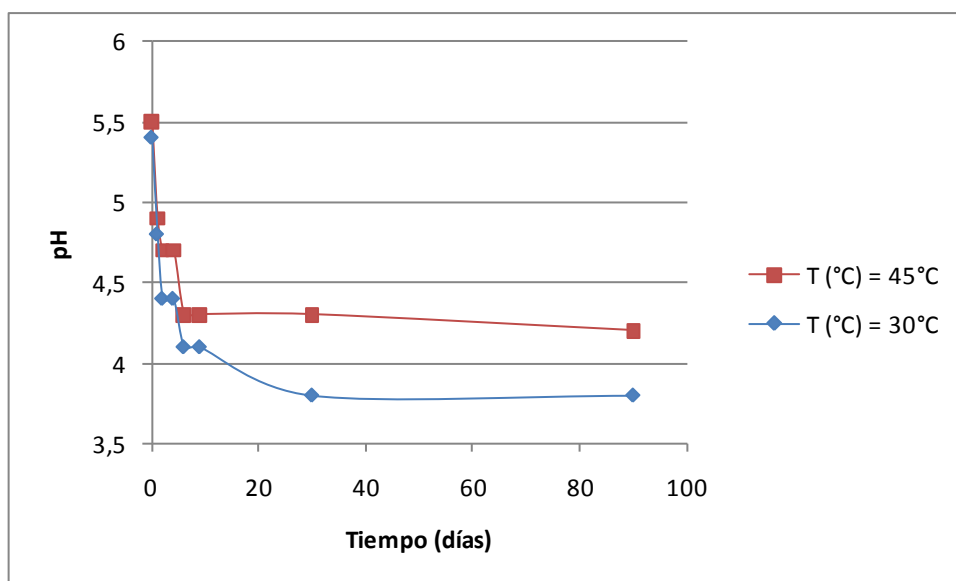


Figura N° 17 Valores de pH en los ensilados almacenados a 45 °C y 30°C.

Se observa que el ensilado almacenado a 30 °C a las 48 horas exhibía un pH igual a 4,4 mientras que el almacenado a 45 °C presentó un pH igual a 4,7; lo cual garantiza rápidamente las condiciones ácidas necesarias para inhibir la actividad bacteriana putrefactiva. Los pH de ambos ensilados siguieron disminuyendo hasta mantenerse constantes al final del período evaluado, este comportamiento también fue reportado por Ottati (1988).

En la siguiente Figura se presentan los cambios evidenciados en la producción de ácido láctico por los ensilados.

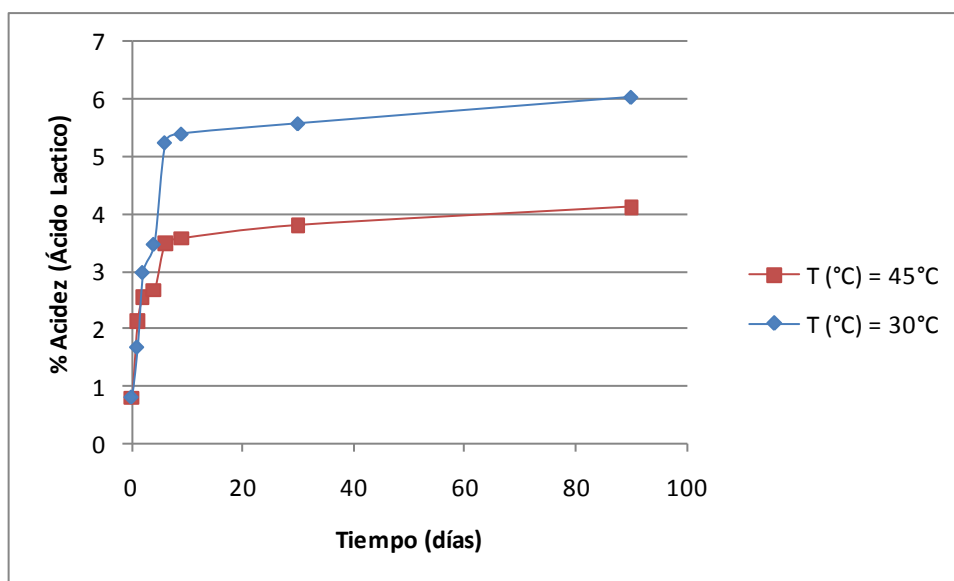


Figura N° 18 Producción de ácido láctico en los ensilados almacenados a 45 °C y 30 °C.

Los cambios evidenciados en los valores de acidez de los ensilados almacenados a 45 °C y 30 °C, en ambos se evidencian incrementos en la producción de ácido láctico a través del tiempo. Este incremento fue mayor en el ensilado almacenado a 30 °C; concordando con que el descenso del pH en este ensilado fue más notorio. La razón por la cual el ensilado almacenado a 30 °C desarrolló mayor acidez, es debido a la naturaleza mesófila del *Lactobacillus bulgaris* que evidenció no tolerar temperaturas iguales o superiores a 45 °C ya que su temperatura óptima de desarrollo se encuentra comprendida entre 25 °C y 45 °C.

El hecho de que el pH y la acidez se mantengan constantes en ambos a partir de los 15 días aproximadamente, se debe al cese del proceso fermentativo como consecuencia de la alta acidez que inhibe a los microorganismos y/o a la disminución de la fuente de carbohidratos incorporado al medio. Esta disminución se aprecia a partir del día 30 en las siguientes tablas que contienen el conteo microbiano.

A continuación se presentan la Tabla N° 14 y Tabla N° 15 que muestran los valores obtenidos para nitrógeno no proteico en los ensilados almacenados a diferentes temperaturas.

Tabla N° 14 Cambios en los valores de conteo de bacterias ácido-lácticas y NNP, durante el almacenamiento a 30 °C.

Tiempo (días)	Bacterias Ácido-Lácticas (Log UFC/g)	Nitrógeno no proteico (% N-Total)
0	7,57	14,51 ± 0,23
6	7,20	61,33 ± 0,19
30	5,11	63,73 ± 0,16
90	2	63,91 ± 0,20

Tabla N° 15 Cambios en los valores de conteo de bacterias ácido-lácticas y NNP, durante el almacenamiento a 45 °C.

Tiempo (días)	Bacterias Ácido-Lácticas (Log UFC/g)	Nitrógeno no proteico (% N-Total)
0	7,57	14,51 ± 0,23
6	6,68	40,88 ± 0,35
30	4,77	58,01 ± 0,47
90	3,71	58,90 ± 0,38

En ambos ensilados se observa que la producción de nitrógeno no proteico aumenta significativamente en los primeros 6 días de almacenamiento, evidenciándose que luego de este período este valor tiende a ser constante.

En la Figura N° 19 se presenta los cambios en los valores de consistencia durante el período de evaluación.

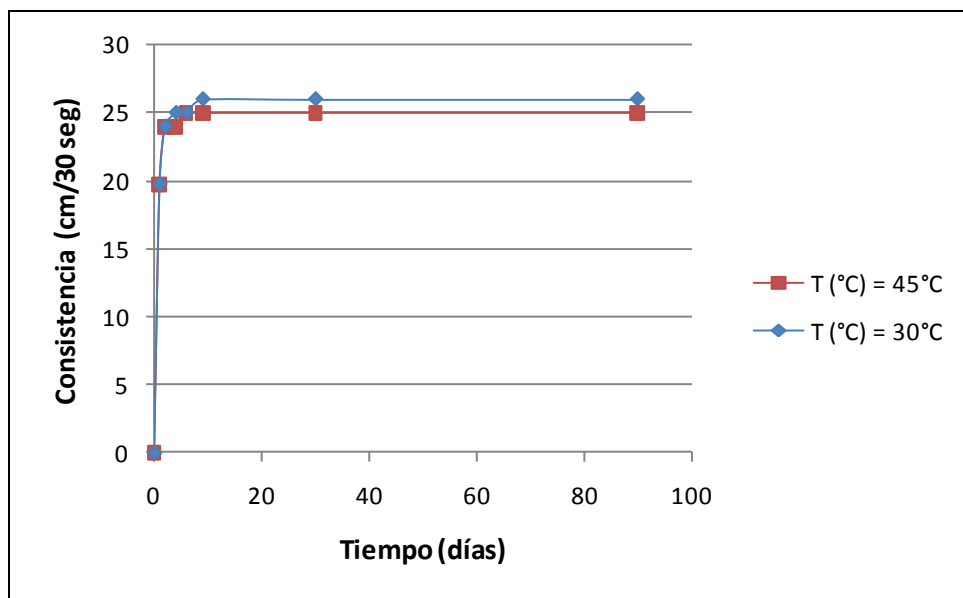


Figura N° 19 Valores de consistencia en los ensilados almacenados a 45 °C y 30°C.

En cuanto a la consistencia se nota que en la primera semana hubo un incremento en estos valores. Respecto a la velocidad, en ambos ensilados se evidencia la misma tendencia, notándose también que los valores se mantuvieron más o menos constantes a lo largo del almacenamiento a partir del día 10. Lo que reafirma que los cambios en la hidrólisis ocurren en los primeros días del proceso. Este comportamiento también fue evidenciado en los cambios de nitrógeno no proteico de los ensilados. Concluyéndose así que almacenar a una temperatura de 30 °C, favorece una mayor producción de ácido láctico y por ende conduce a un descenso del pH a valores inferiores a 4,5 en menor tiempo que el ensilado almacenado a 45°C, al alcanzar esta condición el medio también favore la acción enzimática que se evidencia en los valores de nitrógeno no proteico donde el ensilado a 30°C alcanzó un valor igual a 63,91 mientras que el almacenado a 45°C reportó un valor igual a 58,9; es decir, el hecho de aumentar el consumo energético para almacenar a una temperatura igual a 45°C no favorece significativamente el proceso.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

A continuación se presentan las conclusiones de este Trabajo Especial de Grado:

1. Es necesaria la incorporación de pescados enteros o restos de piel y vísceras, para así garantizar en menor tiempo la acidificación del medio.
2. La autólisis es causada principalmente por las enzimas de las vísceras y del tracto digestivo.
3. El proceso de hidrólisis no resulta ser independiente de la producción de ácido al menos cuando las enzimas de las vísceras están involucradas en las proteólisis.
4. El porcentaje de inóculo que se considera como nivel óptimo es 1 % en peso.
5. La melaza en una concentración de 15% en peso, resultó ser indispensable, ya que ésta es utilizada rápidamente por las bacterias lácticas en la producción de ácido.
6. Una temperatura igual a 35°C, es una temperatura óptima que favorece el proceso de hidrólisis.
7. La actividad de la bromelina es superior a la de la papaína.
8. La incorporación de 0.7% en peso o más de bromelina genera hidrólisis máxima en las proteínas del pescado en 12 horas.
9. Los ensilados se mantienen estables a lo largo de 3 meses tanto a temperatura ambiente como a 45 °C.

CAPÍTULO VI

RECOMENDACIONES

A continuación se presentan algunas recomendaciones con el objeto de producir mejoras en lo referente al tema de este Trabajo Especial de Grado para las investigaciones subsiguientes:

1. Aplicar tratamiento de secado a bajas temperaturas al ensilado para disminuir el contenido de humedad. Esto será en función a las preferencias del consumidor.
2. Se recomienda determinar la concentración de bromelina presente en la fruta (piña), para establecer con exactitud, en base a estos resultados, la cantidad de desechos de piña que habría que agregar para reproducir estos resultados y optimizar el proceso.
3. Se recomienda realizar ensayos en animales alimentados con diferentes dietas, a fin de determinar los índices de conversión en carne y definir las cantidades a utilizar.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, N. 1993. **Elaboración de ensilado biológico de pescado a partir de los fermentos lácticos del yogurt (*Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*)**. Tesis de Magister Scientarum, Postgrado en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Bello, R., Cardillo, E. y Martínez, R. 1993a. **Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado eviscerado**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 43(3); 221-227.

Bello, R., Cardillo, E. y Martínez, R. 1993 b. **Estudio del efecto de la adición de frutas tropicales, piñas (*Ananás comosus*) y lechosa (*Carica papaya*) en la elaboración del ensilado biológico de pescado**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición, 43(3):228-233.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1155-79. **Alimentos concentrados para animales. Determinación de cenizas**. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 6 pp. 1979.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1156-79. **Alimentos concentrados para animales. Determinación de humedad**. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 6 pp. 1979.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1162-79. **Alimentos concentrados para animales. Determinación de grasa**. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 8 pp. 1979.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1195-80. **Alimentos concentrados para animales. Determinación de proteínas.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 11 pp. 1980.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1948-82. **Pescado y productos marinos. Determinación de nitrógeno básico volátil total.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 8 pp. 1982.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 902-87. **Alimentos. Métodos para recuento de colonias de bacterias aerobias en placas de petri.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 4 pp. 1987.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1291-88. **Alimentos. Aislamiento e identificación de *Salmonella*.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 29 pp. 1988.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1292-89. **Alimentos. Aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus*.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 10 pp. 1989.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1337-90. **Alimentos. Método para el recuento de mohos y levaduras.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 6 pp. 1990.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 3123-94. **Alimentos. Recuento de microorganismos acidúricos.** Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 3 pp. 1994.

COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). 1104-96. **Determinación del número más probable de coliformes, coliformes**

fecales y de *Escherichia coli*. Ministerio de Fomento. Caracas. Venezuela. 12 pp. 1996.

Córdova, E. y Bello, R. 1990. **Obtención de ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición.36 (3):522-535.

Guevara, J., Bello, R. y Montilla, J. 1991. **Evaluación del ensilado de pescado elaborado por vía microbiológica como suplemento proteínico en dietas para pollos de engorde.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 41(2):247-256.

Lindgren, S. y Pleaje, M. 1983. **Silage fermentation of fish waste products with lactic acid bacteria.** Journal of Science of Food and Agriculture. 34:1057.

Martínez, R., Pascual, M. y Bello, R. 1991. **Elaboración de ensilados biológicos de pescado en Venezuela y España.** Alimentaria. 28(221):43-49.

Ottati, M. y Bello, R. 1990a. **Ensilado microbiano de pescado en la alimentación porcina. I. Valor nutritivo del producto en dietas para cerdos.** Alimentaria. 27(211):37-44.

Ottati, M. y Bello, R. 1990b. **Ensilado microbiano de pescado en la alimentación porcina. II. Evaluación de la canal y caracterización de la carne.** Alimentaria. 27(212):109-113.

Ottati, M., Gutiérrez, M. y Bello, R. 1990. **Estudio sobre la elaboración de ensilado microbiano a partir de pescado proveniente de especies subutilizadas.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 40(3):408-425.

Reyes, G., Martínez, R., Rodríguez, L., Bello, R. y Pascual, M. 1991. **Efecto de la adición de desechos de frutas tropicales sobre la velocidad de producción de ensilado microbiano de pescado.** Alimentaria. 28(219):99-108.

Rodríguez, T., Montilla, J J. y Bello, R. 1990a. **Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. I. Elaboración y evaluación biológica.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 40(3); 426-438.

Rodríguez, T., Montilla, J J. y Bello, R. 1990b. **Ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. II. Prueba de comportamiento en pollos de engorde.** Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 40(4); 548-559.

Van Wik, H. y Heydenrich, M. 1985. **The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources.** Journal of Science and Agriculture. 36, 1093-1102.

Viete, C. y Bello, R. 1990. **Evaluación del ensilado de pescado elaborado por vía microbiana como suplemento proteico en la dieta de rumiantes.** Informe de Pesca FAO No. 441. Suplemento de la "2da Consulta de expertos en tecnología de productos pesqueros en América Latina. Montevideo, Uruguay. 11-15/12/89." pp.99-106.

ANEXO 1

A continuación se describen los procedimientos que permitieron las caracterizaciones físico-químicas y microbiológicas del sustrato y de la fuente de carbohidratos.

Caracterización Físicoquímica

Dentro de estos análisis se encuentran: contenido de humedad, proteína cruda, grasa cruda, consistencia, ceniza y nitrógeno no proteico en la muestra.

Determinación de Humedad: Norma COVENIN 1156-79

Se sometió una muestra (3g) a desecación durante 3 horas en una estufa a 100°C, con la finalidad de que presentara una pérdida de agua y se dejó secar hasta peso constante.

$$\%H = \frac{(B - A) - (C - A)}{(B - A)} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

H: Humedad (%).

A: Peso de la cápsula seca y limpia (g)

B: Peso de la cápsula + muestra húmeda (g)

C: Peso de la cápsula + muestra seca (g)

Determinación de Cenizas: Norma COVENIN 1155-79

Este método consistió en determinar la masa de residuo inorgánico después de incinerar la muestra (5g), calentándola hasta carbonizar en una plancha de calentamiento, y posteriormente se colocó en una muffle a (500±50) °C por un tiempo aproximado de 4 horas hasta combustión completa.

$$\text{Ceniza}(\%) = \left(1 - \frac{(A - B)}{C} \right) \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

Ceniza: Ceniza (%).

A: Peso del crisol + muestra (g)

B: Peso del crisol con ceniza (g)

C: Peso de la muestra (g)

Determinación de pH (acidez iónica): Norma COVENIN 1315-79

Este método se basó en la medición directa de la concentración de iones hidrógeno presentes en una muestra (10g), homogenizada con 90 mL de agua destilada posteriormente filtrada para así con el uso de un pH-metro calibrado previamente con soluciones tampón pH 7 y pH 4 se determinó el pH de la muestra.

Determinación de Consistencia

Se empleó un consistómetro de Bosjtwick donde se vertirá 5 g de la muestra y se comenzó a realizar el recorrido de la misma. Los resultados se expresaron en cm recorridos/30 s.

Determinación de Nitrógeno y Proteínas: Norma COVENIN 1195-80

El método consistió en dos pasos:

1. Una digestión con ácido sulfúrico concentrado con ayuda de un catalizador para producir una sal amoniacal soluble disociada.
2. Una dosificación del nitrógeno mineral obtenido de la digestión, con ácido clorhídrico normalizado.

Se calculó el % de nitrógeno y el % de proteína.

$$\text{Nitrógeno}(\%) = \frac{(A \cdot B)}{C} \cdot 0,014 \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Proteína Cruda}(\%) = \text{Nitrógeno} \cdot 6,25 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

A: Ácido clorhídrico usado en la titulación (mL)

B: Normalidad del ácido estándar

C: Peso de la muestra (g)

Determinación de Grasa Cruda: Norma COVENIN 1162-79

Método de extracción continua a una muestra (10g), con hexano, en un equipo Soxhlet, durante 2 horas aproximadamente, el solvente se eliminó por evaporación, el residuo se secó en una estufa y se determinó finalmente su masa.

$$\text{Grasa Cruda}(\%) = \frac{(B - A)}{C} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

A: Peso del matraz limpio y seco (g)

B: Peso del matraz con grasa (g)

C: Peso de la muestra (g)

Acidez Total Titulable: Norma N° 10.034 A.O.A.C., 1990.

Se mezcló por 2 minutos la muestra (3g) con 100 mL de agua destilada. El homogenizado se tituló con una solución estándar de hidróxido de sodio 1N. Se calculó en términos de % de ácido láctico.

Caracterización Microbiológica

Estos análisis se realizaron a fin de conocer el contaje de la flora microbiana presente en una muestra (materia prima y ensilados), tomando en cuenta la temperatura y el tiempo de incubación. A continuación se describen los principios de cada uno de ellos:

Preparación de la Muestra y diluciones: Norma COVENIN 1126-77

Preparación de la muestra:

Se pesaron 10 g.de muestra asépticamente, diluyéndolas en 90 ml de agua peptonada al 0,1% previamente esterilizada, obteniéndose de esta forma la dilución madre (dilución 10^0).

Preparación de las diluciones:

Se añadió 1 ml de la dilución 10^0 en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua peptonada al 0,1%, correspondiente a la dilución 10^1 .

Se repitió la misma operación, añadiendo siempre 1 ml de la dilución anterior hasta obtener las diluciones 10^2 y 10^3 .

Recuento de Aerobios Mesófilos: Norma COVENIN 902-78

El recuento se realizó en placas de petri utilizando como medio Agar Plate Count incubando a 37°C por 48 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g).

Recuento de E. Coli en placas Petrifilm: Norma COVENIN 3276-97

El recuento se realizó en placas Petrifilm donde se colocó 1 ml de la muestra diluida en el centro del film inferior, se bajó el film superior con el cuidado de no dejar burbujas, se presionó con el aplicador y se incubó cara arriba a temperatura de 37°C durante 48 horas. Se tomó como positivas las colonias productoras de precipitado azul alrededor de las colonias asociadas con producción de gas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (NMP/g).

Recuento de Enterobacterias en Placas Petrifilm

Con una pipeta perpendicular se inoculó 1 ml de la muestra diluída en el centro del film inferior, se bajó el film superior con el cuidado de no dejar burbujas, se presionó con el aplicador y se incubó cara arriba a 37 °C durante 24 horas. Se tomó como positivas las bacterias productoras de gas y ácido por formación de burbujas y decoloración (amarilla) del área alrededor de la colonia. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g).

Recuento de Mohos y levaduras: Norma COVENIN 1337-90

Este análisis se realizó en placa de Petri utilizando como medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), se incubó a 30 °C por 72 horas. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonia por gramo de muestra (UFC/g).

Recuento de Salmonella: Norma COVENIN 1291-88

El análisis se basó en dos pasos:

1. Enriquecimiento: se tomó una muestra de 25g y se mezcló con 225 ml de Caldo Selenito-Cristina (SC) y se incubó a 37°C por 24 horas.
2. Aislamiento: una muestra del enriquecimiento se incubó, en placas de Petri conteniendo Agar Salmonella-Shigella (S-S), a 37°C durante 24 horas.

ANEXO 2

Procedimiento experimental seguido para la elaboración de los ensilados

Selección de la Materia prima: pescados, residuos de pescados como vísceras, espinazos, piel, escamas, cabezas se obtuvo de A.P.C. Planta Marigüitar.

Lavado: se realizó un lavado de la materia prima con agua de grifo a temperatura ambiente con la finalidad de reducir las impurezas presentes, luego se lavó con una solución de agua clorada por un tiempo de 30 minutos para eliminar la sangre y otras impurezas y se almacenó en congelación hasta su procesamiento.

Pesado: se pesó la materia prima inicial; es decir, la que se utilizó para realizar las experiencias con la finalidad de conocer la cantidad de materia prima y así poder calcular el rendimiento.

Molienda: se utilizó un Cutter Homogenizador Marca Stephan para disminuir el tamaño de partículas y obtener una pasta de consistencia uniforme que permita un contacto homogéneo con los demás ingredientes y fermentos.

Mezclado: la pasta de pescados se colocó en un homogeneizador marca Stephan donde se le adicionó los demás ingredientes de acuerdo a las diferentes formulaciones preliminares escogiéndose la siguiente: adición de 15% en peso de melaza, seguido de 1% en peso de inóculo de bacterias lácticas y como agente antimicótico, 0,25% en peso de ácido sórbico, y finalmente se mezcló uniformemente hasta obtener una pasta homogénea.

Almacenamiento e incubación: los ensilados se almacenaron en envases de plástico para la fermentación a una temperatura igual a (30 ± 2) °C que corresponde con la temperatura ambiente.

A continuación se presenta el esquema de elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado:

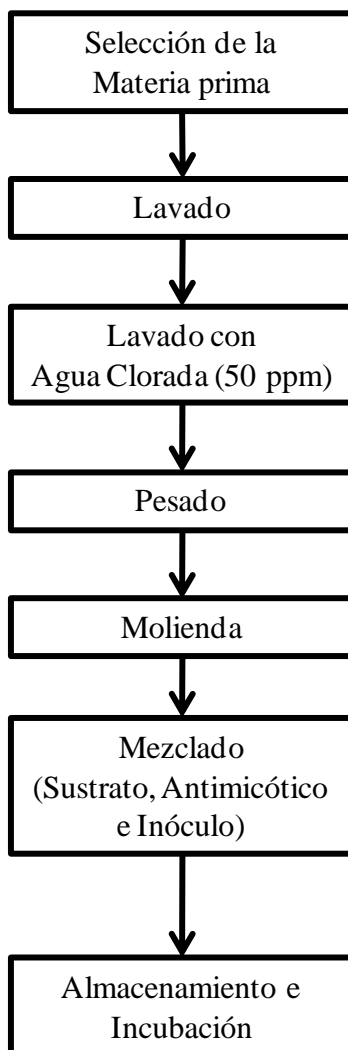


Figura N° 20 Esquema de Elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado

El siguiente esquema es el correspondiente a la elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado con adición de una enzima:

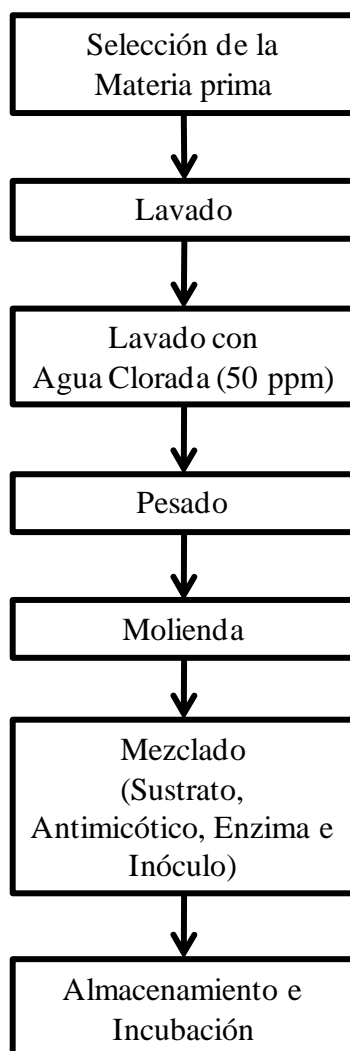


Figura N° 21 Esquema de Elaboración de Ensilado Microbiano de Pescado con adición de Enzima

ANEXO 3**Determinación de la actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de bromelia y papaína.**

Preparación de la muestra

El flujograma seguido para la preparación de la muestra se presenta a continuación:

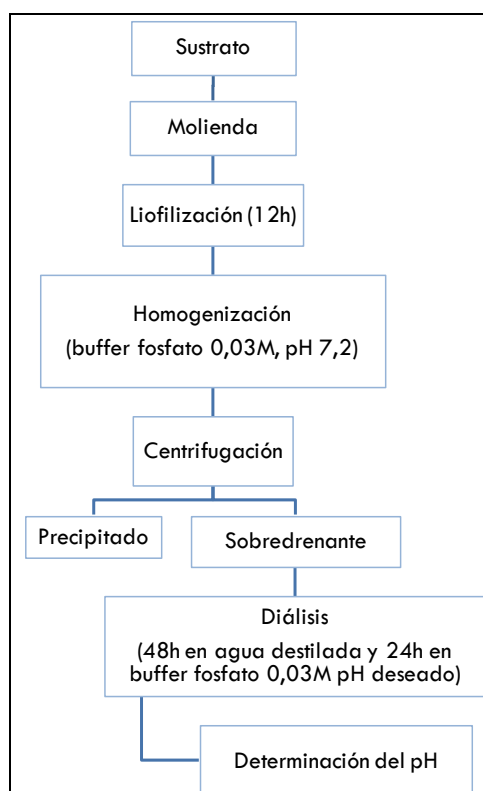


Figura N° 22 Preparación de la muestra para la determinación de la actividad proteolítica de las preparaciones comerciales de papaína y bromelina.

Preparación de las enzimas

Papaína

La papaína cruda es insoluble en agua, pero bastante soluble en solución buffer de fosfato 0,3M y pH 6,2. Se disolvieron 60 mg de la enzima en 50 ml del buffer antes mencionado. La solución se centrifugó durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró empleando papel de filtro Whatman N° 1 y se dializó durante 24 horas en tubos de diálisis de apertura de poro de 12000 Dalton contra un buffer fosfato 0,03M del pH deseado. Es decir, para ensayar su actividad a pH 7 el buffer empleado debía tener este valor de pH, y así sucesivamente. Posteriormente las muestras fueron recolectadas, se verificó su pH y fueron almacenadas hasta ser usadas.

La concentración final de esta solución no debe ser menor de 1mg/ml.

Bromelina

Esta enzima en forma cristalina, es soluble en agua. Se preparó una solución de concentración superior a 20 mg/ml y posteriormente se sometió al mismo proceso de diálisis que la papaína.

A continuación se presenta en la Figura N° 23 y Figura N° 24 el procedimiento seguido.

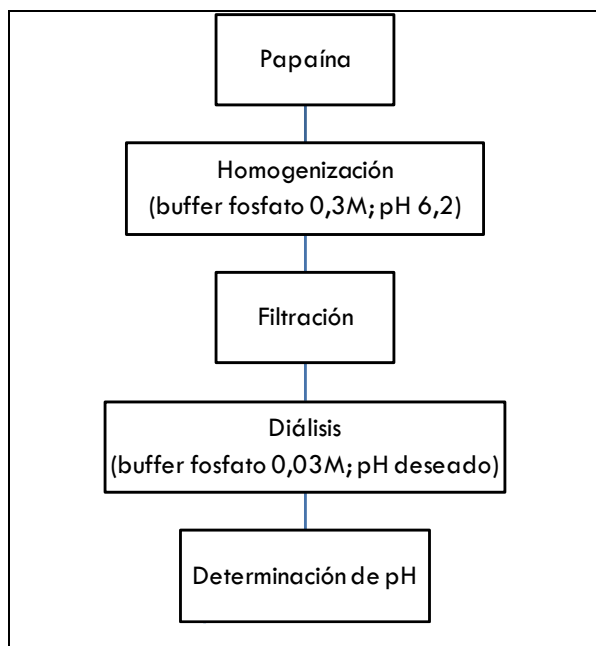


Figura N° 23 Preparación de papaína para determinar su actividad proteolítica.

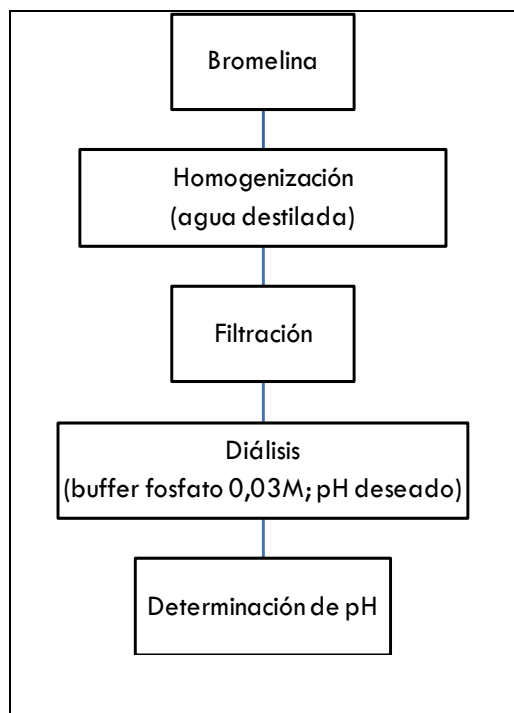


Figura N° 24 Preparación de bromelina para determinar su actividad proteolítica.

Medición de la actividad enzimática

Para medir la actividad de estas dos enzimas sobre las proteínas de la carne del pescado, se siguió el método de Kunitz 1947 modificado por Arnoon y Shapira 1967, y se basaron en la estimación de los productos de digestión de bajo peso molecular formados a partir de las proteínas del pescado en presencia de las correspondientes enzimas. Los ensayos se efectuaron a 35°C (temperatura óptima de operación) para ambas enzimas y con un tiempo de incubación de 20 minutos. Para determinar la actividad caseinolítica de ambas enzimas se utilizó como tiempo de incubación 10 minutos.

Todos los ensayos de actividad enzimática se realizaron para una concentración de 30 mg/ml de proteína.

Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la bromelina

Para estudiar el efecto del tiempo sobre la actividad de la bromelina en la hidrólisis de las proteínas del pescado a pH 5,5 se incubaron tubos de ensayo a una temperatura igual a 35°C empleando diversos tiempos de incubación (30, 40, 50, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos).

Cada tubo de ensayo contenía una solución con 30 mg/ml de proteína de pescado y una alícuota de enzima además de los reactivos descritos en la Figura N° 25.

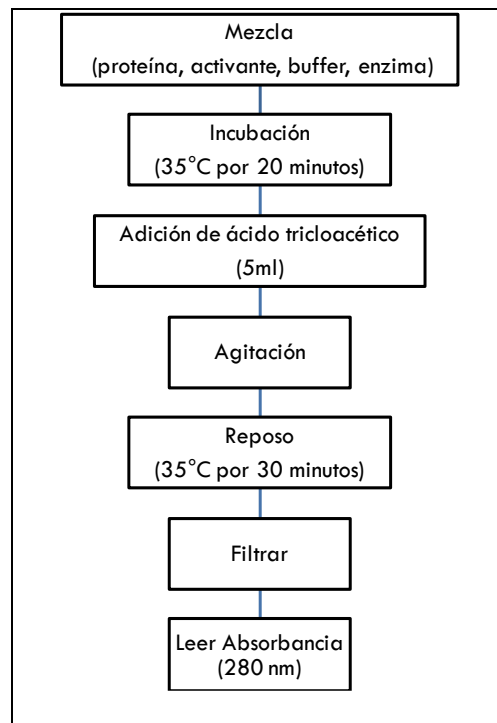


Figura N° 25 Medición de actividad proteolítica de la enzima.

ANEXO 4

Cálculos intermedios

Caracterización mediante métodos físico-químicos y microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.

PARÁMETRO	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12
Humedad (%)	76,40	76,50	76,50	76,57	76,62	76,55	76,72	76,45	76,70	76,60	76,62	76,70
Proteína cruda(%)	17,14	17,00	17,12	16,98	17,00	17,12	17,24	17,36	17,00	17,10	17,72	17,41
Grasa (%)	5,66	5,72	5,80	5,60	5,50	5,45	5,40	5,70	5,30	5,60	5,30	5,60
Cenizas (%)	0,60	0,55	0,66	0,49	0,51	0,53	0,55	0,61	0,58	0,67	0,61	0,65
pH	6,60	6,50	6,70	6,45	6,55	6,60	6,60	6,63	6,67	6,45	6,60	6,50
N.B.V.T. (mg N/100g)	9,40	9,50	9,45	9,60	9,60	9,50	9,40	9,40	9,80	9,60	9,56	9,59

Caracterización mediante métodos microbiológicos los residuos provenientes del procesamiento de atún y fileteado de diversas especies de pescado.

PARÁMETRO	Día 1	Día 14
Aerobios mesófilos (UFC/g)	2,5x10 ⁵	2,5x10 ⁶
Mohos (UFC/g)	2x10	2,5x10
Levaduras (UFC/g)	8,8x10	9x11
E. coli (NMP/g)	7,00	7,00
Salmonella	Negativo	Negativo

Caracterización mediante métodos físico-químicos y microbiológicos de la melaza

PARÁMETRO	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3
Sólidos Totales	82,75	82,80	82,85
Humedad (%)	17,23	17,16	17,35
Cenizas (%)	8,15	8,20	8,35
pH	5,50	5,55	5,53
°Brix	82,65	82,70	82,55
Aerobios Mesófilos (UFC/g)	7,2x10 ⁴	8x10 ⁴	7,5x10 ⁴

Experiencia 1 (Ensilados no inoculados)

A continuación se presentan los resultados intermedios obtenidos en esta experiencia, donde se reportan 6 días de los 14 días de evaluación.

Ensilado A

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 3			Día 7			Día 14		
pH	5,50	5,45	5,60	4,50	4,55	4,40	4,30	4,30	4,31	4,20	4,23	4,23	4,00	4,00	4,05	4,05	3,99	4,01
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,70	0,67	0,69	1,00	0,90	0,95	2,10	2,07	2,13	2,30	2,30	2,26	3,30	3,30	3,29	3,30	3,33	3,28
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,70	2,80	3,00	3,00	3,10	3,10
Nitrógeno no proteico (%N-total)	15,10	15,00	15,00										40,90	40,88	40,91	43,20	43,17	43,20

Ensilado B

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 3			Día 7			Día 14		
pH	5,55	5,60	5,60	4,90	4,92	4,90	4,50	4,47	4,47	4,30	4,32	4,31	4,30	4,30	4,29	4,30	4,29	4,29
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,70	0,68	0,71	1,40	1,40	1,38	2,40	2,43	2,41	2,40	2,40	2,38	2,90	2,89	2,92	3,20	3,18	3,21
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,40	0,40	3,00	3,50	3,10	15,00	14,80	14,90
Nitrógeno no proteico (%N-total)	13,30	13,10	13,10										47,80	47,75	47,83	51,60	51,62	51,60

Ensilado C

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 3			Día 7			Día 14		
pH	5,92	5,88	5,90	6,00	5,88	6,01	4,61	4,57	4,62	4,55	4,60	4,60	4,31	4,27	4,30	4,30	4,30	4,31
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,54	0,55	0,54	1,72	1,75	1,71	2,51	2,55	2,53	2,89	2,90	2,91	3,02	3,00	2,98	3,69	3,71	3,70
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,50	0,60	0,50	2,25	2,25	2,25	7,50	7,00	8,00	21,00	20,50	21,00	24,00	24,00	25,00
Nitrógeno no proteico (%N-total)	14,50	14,60	14,55										61,50	61,50	61,60	74,60	74,45	74,50

Experiencia 2 (Ensilados inoculados)

A continuación se presentan los resultados intermedios obtenidos en esta experiencia, donde se reportan 6 días de los 14 días de evaluación.

Ensilado A

PARÁMETRO	Día 0			Día1			Día 2			Día 3			Día 7			Día 14		
pH	5,10	5,09	5,11	4,31	4,33	4,29	4,21	4,19	4,20	4,12	4,11	4,11	4,00	3,99	4,01	3,80	3,81	3,82
% Acidez (% Ácido Láctico)	1,08	1,11	1,10	2,77	2,79	2,80	3,45	3,50	3,50	3,68	3,70	3,66	5,16	5,13	5,15	6,22	6,20	2,24
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,50	0,50	0,65	2,25	2,50	2,40	7,50	7,60	7,55	21,00	20,50	20,50	24,00	24,00	25,00
Nitrógeno no proteico (%N-total)	15,70	15,65	15,65										67,60	67,50	67,50	82,10	82,13	82,09

Ensilado B

PARÁMETRO	Día 0			Día1			Día 2			Día 3			Día 7			Día 14		
pH	5,50	5,45	4,47	4,50	5,47	5,51	4,30	4,26	4,32	4,20	4,21	4,23	4,00	3,99	4,02	4,20	4,23	4,21
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,69	0,70	0,70	2,01	2,05	2,06	3,12	3,11	3,09	4,19	4,21	4,21	5,07	5,05	5,05	5,24	5,30	5,26
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,30	0,25	3,00	3,00	2,85	14,50	14,50	15,00
Nitrógeno no proteico (%N-total)	13,60	13,50	13,55										34,80	34,85		51,80	51,82	51,79

Ensilado C

PARÁMETRO	Día 0			Día1			Día 2			Día 3			Día 7			Día 14		
pH	5,61	5,60	5,63	4,50	4,51	5,49	4,30	4,29	4,32	4,30	4,30	4,29	4,22	4,24	4,25	4,13	4,10	4,11
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,76	0,77	0,75	2,40	2,41	2,41	2,75	2,73	2,73	3,00	2,95	3,07	4,46	4,48	4,42	5,61	5,61	5,64
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25	0,30	3,00	3,10	3,10
Nitrógeno no proteico (%N-total)	14,80	14,76	14,81										32,40	32,36	32,35	46,10	46,13	46,09

Temperatura óptima de operación (Ensilado A inoculado)

A continuación se presentan los resultados intermedios obtenidos en esta experiencia, donde se reportan 6 días de los 26 días de evaluación.

Ensilado a 15°C

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 5			Día 9			Día 12		
pH	5,82	5,85	5,86	4,77			4,36	4,38	4,39	4,45	4,50	4,49	4,44	4,42	4,45	4,39	4,40	4,39
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,96	0,95	0,97	2,09	2,11	2,1	2,94	2,96	2,96	4,58	4,60	4,60	4,95	5,00	4,98	5,78	5,75	5,80
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,25	1,25	1,35

Ensilado a 25°C

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 5			Día 9			Día 12		
pH	5,82	5,81	5,84	4,64	4,66	4,66	4,49	5,50	4,52	4,44	4,45	4,50	4,41	4,40	4,40	4,38	4,60	4,50
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,96	0,98	0,95	2,39	2,41	2,37	3,39	3,41	3,41	4,90	4,88	4,95	5,17	5,21	5,20	5,39	5,37	5,40
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,25	2,30	2,30	5,25	5,50	5,50

Ensilado a 35°C

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 5			Día 9			Día 12		
pH	5,82	5,85	5,81	4,63	4,65	4,62	4,52	5,10	4,51	4,40	4,38	4,41	4,40	4,40	4,37	4,37	4,30	4,40
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,96	1,01	0,97	3,01	3,00	3,00	3,68	3,70	3,70	5,95	5,96	5,94	5,30	5,45	5,40	5,43	5,41	5,45
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	2,00	2,50	3,00	8,25	8,30	3,35	11,50	12,00	11,75	24,00	25,00	25,00

Ensilado a 45°C

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 5			Día 9			Día 12		
pH	5,82	5,85	5,81	5,33	5,35	5,31	4,50	4,53	4,53	4,38	4,40	4,41	3,46	3,46	4,50	4,42	4,45	4,50
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,96	0,98	0,98	1,82	1,83	1,81	5,25	5,32	5,31	5,44	5,46	5,43	5,44	5,41	5,47	5,29	5,30	5,27
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	2,00	2,25	2,00	8,00	8,25	8,50	19,00	18,75	19,10	25,00	25,10	25,50	25,00	25,20	25,10

Ensilado a 55°C

PARÁMETRO	Día 0			Día 1			Día 2			Día 5			Día 9			Día 12		
pH	5,82	5,81	5,81	5,80	5,80	5,82	5,80	5,79	5,79	5,75	5,76	5,76	5,70	5,69	5,68	5,56	5,55	5,53
% Acidez (% Ácido Láctico)	0,96	0,97	0,95	1,60	1,58	1,61	1,93	1,95	1,91	2,20	2,19	2,22	2,19	2,22	2,25	2,24	2,21	2,25
Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	4,50	4,60	4,55	13,00	13,10	13,20	22,25	22,10	22,10	25,00	25,10	25,25	25,00	25,50	25,30

Experiencia 3 (Ensilados inoculados)

A continuación se presentan los resultados intermedios obtenidos en esta experiencia, donde se reportan 4 horas del intervalo evaluado.

	PARÁMETRO	Hora 0			Hora 3			Hora 12			Hora 24		
E1 (0.9%)	Consistencia (cm/ 30seg)	0,75	0,65	0,70	17,00	17,10	17,10	24,00	24,10	24,20	25,00	25,20	25,20
	Nitrógeno no proteico (%N-total)	35,47	35,50	35,51	78,46	78,47	78,42	82,55	82,50	82,51	87,31	87,32	87,35
E2 (0.7%)	Consistencia (cm/ 30seg)	1,50	1,55	1,60	13,00	12,90	13,00	25,00	25,25	25,00	25,00	25,10	25,10
	Nitrógeno no proteico (%N-total)	26,33	26,40	26,37	72,93	72,95	72,95	87,68	87,70	87,70	91,38	91,40	91,38
E3 (0.45%)	Consistencia (cm/ 30seg)	0,50	0,51	0,49	8,50	8,49	8,51	19,50	19,55	19,52	25,00	25,20	25,10
	Nitrógeno no proteico (%N-total)	27,40	27,45	27,41	73,49	73,47	73,50	76,44	76,41	76,40	78,88	78,86	78,90
E4 (0.2%)	Consistencia (cm/ 30seg)	0,50	0,55	0,60	3,50	3,40	3,55	9,50	9,55	9,60	16,00	16,10	15,90
	Nitrógeno no proteico (%N-total)	20,46	20,47	20,51	61,53	61,55	61,51	67,43	67,45	6,41	69,49	69,50	69,47
EC (control)	Consistencia (cm/ 30seg)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Nitrógeno no proteico (%N-total)	13,30	13,32	13,35	13,90	13,89	13,91	22,60	22,60	22,57	32,80	32,77	32,81