



005676
2eq.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UN ALIMENTO PARA AVES
A BASE DEL ENSILAJE
DE DESPERDICIOS DE ATUNERAS

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIA DE ALIMENTOS
(OPCION: QUIMICA DE ALIMENTOS)

PRESENTA:
LUIS ANTONIO VIZCARRA MAGAÑA



México, D.F.,

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

266772



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: DRA. MARIA DEL CARMEN WACHER RODARTE
PRIMER VOCAL: DR. ERNESTO AVILA GONZALEZ
SECRETARIO: M. EN C. RUTH PEDROZA ISLAS
PRIMER SUPLENTE: DRA. SARA VALDES MARTINEZ
SEGUNDO SUPLENTE: M. EN C. FRANCISCA AIDA ITURBE CHIÑAS

DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. ANGELA SOTELO LOPEZ

SUSTENTANTE:

LUIS ANTONIO VIZCARRA MAGAÑA

LUGAR DE REALIZACION DEL TRABAJO:

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA
FACULTAD DE QUIMICA
UNAM**

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir.

A mis padres:

*Por tenerme la confianza y la fe, por no
escatimar en sus esfuerzos en mí y por su buen
ejemplo.*

A mis hermanos:

*Por compartir sus conocimientos, por
escucharme, por darme ánimos, por confiar
en mí.*

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer de manera muy sincera a la Maestra Angela Sotelo, por su acertada dirección a lo largo de este proyecto, por el valor de sus conocimientos, por permitirme entrar a su laboratorio, pero sobre todo, por su amistad, y por darme su apoyo y su confianza en los momentos difíciles.

Agradezco al Dr. Ernesto Avila, de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por toda su ayuda durante el experimento con aves, por todos sus consejos y sus buenos comentarios, pero además, por su trato tan amistoso y sencillo, para quienes hemos tenido la gran oportunidad de ser sus alumnos. Agradezco también a todo el personal de la Granja Avícola de esta Facultad (CEIEPA), por la hospitalidad y la ayuda ofrecida durante esta prueba.

Agradezco a la Dra. Carmen Wachter, a la Maestra Ruth Pedroza, a la Dra. Sara Valdés y a la Maestra Francisca Iturbe, por todos sus comentarios y aportaciones hechas sobre esta tesis, lo cual fue muy enriquecedor.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por aceptarme para cursar este estudio de posgrado, a CONACYT por su ayuda económica, lo cual me permitió dedicarme de tiempo completo a mis estudios, a la Universidad Autónoma de Sinaloa y a sus maestros, por toda su ayuda moral y económica, lo cual hizo posible que pudiera cursar estos estudios, a todos ellos gracias por darme esta gran oportunidad de superarme.

Agradezco al Maestro Bernardo Lucas, a Leticia Gil, a la Señora Vicky, a Mario Ruiz y a todas las personas que trabajan en el laboratorio 111, por su ayuda técnica y su amistad.

Agradezco también a los Ingenieros, Armando Coppel, Francisco Soria y Leonardo Alvarez, de *Atunes y Derivados, S.A. de C. V.*, de Mazatlán, Sinaloa; por las facilidades ofrecidas para la obtención de muestras de materia prima.

Agradezco también a los Ingenieros, Juan Antonio Cortez y José Luis Cruz del Instituto Tecnológico del Mar ubicado en Mazatlán, por las facilidades brindadas durante la etapa de ensilaje a escala piloto, al darme acceso a sus instalaciones. También agradezco al Ing. Apolonio Osuna, por su ayuda tan oportuna durante esta etapa y por su amistad.

Agradezco al Dr. Carlos Martínez Palacios del CIAD (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo) de Mazatlán, por permitir el secado del producto en sus instalaciones, también agradezco a la M. C. Crisantema Hernández, por su asesoría técnica para el secado, y a todo el personal de este centro de investigación, por su desinteresada colaboración y amabilidad.

Agradezco también al Maestro Miguel Hernández y a la Q.F.B. Virginia Souza del CMN, por su ayuda para las determinaciones de lisina disponible y minerales en su laboratorio.

A mis maestros, por su paciencia y su interés en compartir conmigo, su extensa y valiosa experiencia. A mis compañeras, Carmen Santillán y Prisila Balarezo, por compartir tantos momentos gratos y otros difíciles a lo largo de esta maestría.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
1- INTRODUCCION	1
2- ANTECEDENTES	5
2.1 Industria atunera mexicana	6
2.1.1 Antecedentes de la pesca en México	6
2.1.2 Liderazgo de la flota atunera mexicana en el Oceano Pacifico Oriental	7
2.1.3 Importancia del atún aleta amarilla en las capturas de la flota mexicana	9
2.1.4 Plantas procesadoras y comercialización	10
2.2 Métodos de producción del ensilaje	12
2.3 Composición del ensilaje	16
2.4 Cambios químicos que ocurren en el ensilaje	20
2.4.1 Nitrógeno no proteínico y actividad proteolítica	20
2.4.2 Formación de bases volátiles	23
2.4.3 Cambios relacionados con el aceite	26
2.5 Valor nutricional del ensilaje	30
2.6 Otras aplicaciones de los ensilajes	35
3- OBJETIVOS	38

4- PARTE EXPERIMENTAL	40
4.1 Etapa 1: Primer ensayo para obtener el ensilaje a nivel laboratorio	42
4.1.1 Materias prima	43
4.1.2 Preparación de los ensilajes	44
4.1.3 Caracterización de las materias primas	45
4.1.4 Monitoreo de parámetros durante el proceso del ensilaje	46
4.2 Etapa 2: Segundo ensayo para obtener el ensilaje a nivel laboratorio	47
4.2.1 Preparación de los ensilajes	48
4.2.2 Análisis proximal, nitrógeno no proteínico y pH	48
4.2.3 Medición de la actividad proteolítica	48
4.2.3.1 Obtención del extracto enzimático	49
4.2.3.2 Medición de proteína por el método de Lowry	51
4.2.4 Determinación del grado de oxidación en la grasa de los ensilajes por el método del ácido tiobarbitúrico	51
4.2.5 Medición de trimetilamina	52
4.2.6 Pruebas de secado y análisis realizados al producto final del ensilaje	52
4.3 Etapa 3: Obtención del ensilaje a nivel de planta piloto y su evaluación nutricia en pollos de engorda	54
4.3.1 Preparación del ensilaje	54
4.3.2 Secado del ensilaje	55
4.3.3 Pruebas de alimentación en pollos de engorda	56
4.3.3.1 Manejo de las aves	56

5- RESULTADOS Y DISCUSION	61
5.1 Resultados y discusión de la etapa 1	62
5.1.1 Análisis proximal de las materias primas	62
5.1.2 pH	63
5.1.3 Nitrógeno total, nitrógeno no proteínico y nitrógeno soluble	67
5.1.4 Análisis microbiológicos	75
5.1.5 Conclusiones de la primera etapa	77
5.2 Resultados y discusión de la etapa 2	78
5.2.1 Análisis proximal de la materia prima	78
5.2.2 pH	79
5.2.3 Nitrógeno no proteínico y actividad proteolítica	82
5.2.4 Trimetilamina	89
5.2.5 Oxidación de la grasa	91
5.2.6 Comentarios sobre la prueba de secado	95
5.2.7 Lisina disponible	96
5.2.8 Triptofano	97
5.2.9 Minerales	98
5.3 Resultados y discusión de la etapa 3	100
5.3.1 Composición del producto seco (ensilaje+sorgo)	100
5.3.2 Ganancia en peso, consumo de alimento y conversión alimenticia	104
5.3.3 Mortalidad	109
5.3.4 Consumo de agua durante el experimento	110
6- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	111
7- ANEXOS	116
8- BIBLIOGRAFIA	136

INDICE DE TABLAS

1- Capturas por especies y países en el Océano Pacífico Oriental	8
2- Composición de las dietas experimentales	59
3- Análisis calculado de las dietas para la prueba biológica con pollos de engorda	60
4- Análisis proximal de las materias primas (etapa 1)	63
5- Comportamiento del pH durante 35 días	65
6- Nitrógeno total (NT), soluble (NS) y no proteínico (NNP) en las materias primas	67
7- Evolución del NNP del ensilaje elaborado con ácido fórmico solo	69
8- Evolución del NS del ensilaje elaborado con ácido fórmico solo	69
9- Evolución del NNP del ensilaje elaborado con ácido fórmico + clorhídrico	70
10- Evolución del NS del ensilaje elaborado con ácido fórmico + clorhídrico	70
11- Evolución del NNP del ensilaje elaborado con ácido fórmico + sulfúrico	71
12- Evolución del NS del ensilaje elaborado con ácido fórmico + sulfúrico	71
13- Análisis microbiológico	76
14- Análisis proximal de materia prima (etapa 2)	78
15- Comportamiento del pH durante 60 días	81
16- Nitrógeno total, soluble y no proteínico de la materia prima (etapa 2)	82
17- Evolución de NNP en los ensilajes durante 20 días	84
18- Contenido de proteína en el extracto de víscera	86
19- Diluciones de extracto de víscera en buffer citrato-fosfato a pH=3 empleadas para la prueba de actividad	87
20- Mediciones de actividad proteolítica al extracto de víscera	87
21- Comportamiento de la trimetilamina durante 60 días de ensilaje	89
22- Número de ácido tiobarbitúrico en las materias primas por separado	91
23- Número de ácido tiobarbitúrico en los ensilajes durante 60 días	92
24- Contenido de lisina disponible en la materia prima, ensilaje liofilizado y producto seco	97
25- Contenido de triptofano en la materia prima y en el ensilaje liofilizado	97

26- Contenido de minerales en materia prima y ensilaje liofilizado	99
27- Análisis proximal del producto seco ensilaje+sorgo (70:30) obtenido a nivel de planta piloto	101
28- Contenido de minerales al producto seco ensilaje+sorgo (70:30)	101
29- Contenido de aminoácidos en el producto seco ensilaje+sorgo (70:30)	103
30- Incremento semanal de peso en los pollos alimentados con diferentes niveles de ensilaje	104
31- Resumen de la evaluación biológica del ensilaje con pollos de engorda	105

INDICE DE FIGURAS

1- Plan general de trabajo	41
2- Diagrama de actividades de la primera etapa	42
3- Diagrama de actividades de la segunda etapa	47
4- Diagrama de obtención del extracto enzimático	50
5- Comportamiento del pH en ensilajes	66
6- Evolución del nitrógeno no proteínico	72
7- Evolución del nitrógeno soluble	73
8- Evolución del nitrógeno no proteínico (etapa 2)	83
9- Curva de actividad proteolítica	88
10-Curva de trimetilamina en los ensilajes durante 60 días	90
11-Número de ácido tiobarbitúrico en los ensilajes durante 60 días	93
12-Consumo de alimento durante 14 días, usando distintos niveles de ensilaje de atún	106
13-Curva de crecimiento de los pollos, usando distintos niveles de ensilaje de atún	107

RESUMEN

En esta tesis se propuso utilizar el desperdicio de las plantas enlatadoras de atún, procesándolo en forma de ensilaje ácido.

El desperdicio del proceso del enlatado, se compone de la víscera fresca y desperdicio cocido (musculatura oscura del pescado mezclada con espinas, cabezas y colas). Para la elaboración de los ensilajes, la víscera fresca y el material cocido se mezclaron en la proporción que normalmente se generan en la planta (4:1, carne negra: víscera).

El estudio se dividió en 3 etapas: Las dos primeras consistieron en ensayos para obtener el ensilaje a nivel laboratorio. En la primera etapa se caracterizó la composición proximal del ensilaje, se probaron diferentes ácidos para preparar los ensilajes, se monitorearon los cambios de nitrógeno no proteínico, nitrógeno soluble y las variaciones de pH, además fue evaluada su estabilidad microbiológica en cuanto a mesófilos aeróbios, coliformes totales, hongos y levaduras. Se encontró que en los primeros 20 días se dieron los cambios mas notorios de nitrógeno no proteínico y nitrógeno soluble, el pH después de 24 horas no presentó cambios significativos y la calidad microbiológica fue adecuada. Con base en estos resultados se seleccionó la mezcla de ácido para preparar los ensilajes que se elaboraron en la segunda etapa.

En la segunda etapa se monitorearon los cambios en la concentración de trimetilamina y el grado de oxidación de la grasa. A la víscera se le midió su actividad proteolítica. Se midió el triptofano para conocer si éste se había

afectado en relación a su contenido en la materia prima, encontrándose pérdidas del 39 %. Se hicieron mediciones de lisina disponible, encontrándose que las pérdidas no sobrepasaron el 8 %. En esta segunda etapa se realizaron mediciones de los siguientes minerales: fierro, calcio, fósforo, zinc, sodio, y potasio.

En la tercera etapa, se preparó el ensilaje a nivel piloto para realizar la prueba de evaluación biológica con pollos de engorda. Para secar el ensilaje, éste se mezcló con sorgo molido (70:30, ensilaje húmedo: sorgo) y se secó a 40°C. Con el producto seco se realizó la prueba biológica, demostrándose que se puede incluir hasta un 15 % del producto sin que se afecte la conversión alimenticia. Por otro lado el producto no mostró efectos adversos en el desarrollo de los pollos lo que demuestra su inocuidad.

1- INTRODUCCION

El ensilaje inició como una práctica ganadera en Europa desde hace siglos como una medida de conservación de productos agrícolas durante el invierno, desde este punto de vista el ensilaje se define como el alimento para animales que resulta de la conservación anaeróbica de forrajes húmedos o residuos agrícolas por acidificación. La acidificación puede llevarse a cabo mediante la aplicación directa de ácidos o por la producción de los mismos durante la fermentación (Tejada, 1983). Esta tecnología también se utiliza en subproductos de origen animal.

El ensilado de pescado es un producto líquido, elaborado de pescado entero o partes del mismo al que se le ha aplicado un ácido, y la licuefacción de la masa se lleva a cabo por las enzimas ya presentes en el pescado (Tatterson y Windsor, 1974). El ácido permite disminuir el pH dando un medio propicio para la actividad enzimática, además de que inhibe el crecimiento de microorganismos (Strasdine y cols., 1988).

El ensilaje hecho con ácidos orgánicos o minerales es comúnmente denominado ensilaje ácido de pescado, mientras que aquel que requiere la adición de una fuente de carbohidratos y un almacenamiento en condiciones anaeróbicas es conocido como ensilaje biológico de pescado, en este último, el ácido que propicia la actividad enzimática es el ácido láctico producido por bacterias previamente inoculadas (Strom, 1992; Pérez 1995).

La elaboración de ensilaje de pescado fue iniciada por primera vez a nivel comercial en Dinamarca en 1948 y 3 años después, su producción fue de 15,000 toneladas por año distribuidas en 14 compañías, en 1992 la elaboración de este

producto en Noruega alcanzó las 60,000 toneladas anuales (Aranson, 1994), a pesar de esto en términos generales la producción comercial de ensilaje de pescado ha sido muy limitada, sin embargo un renovado interés en esta tecnología ha aumentado debido a los problemas de desperdicios generados en la industria acuícola (Gildberg, 1993).

La tecnología de la elaboración de ensilajes de pescado y su utilización para la alimentación de ganado no constituye una nueva idea, pues esto se conoce desde hace algún tiempo, pero la aplicación comercial aún no se ha extendido debido a que los criadores de aves y ganado requieren del pleno convencimiento de que estos productos pueden ser exitosamente incorporados a los alimentos para animales (Pérez, 1995).

La obtención de proteínas de bajo costo, hoy día se plantea como una problemática a nivel de producción de alimentos de buena calidad, con el fin de suplir las deficiencias existentes a nivel mundial; una de las posibles vías que ha sido objeto de estudio es la elaboración de concentrados proteínicos solubles, altamente nutritivos, utilizando pescado como materia prima (Bello y Fernández, 1993).

México es un país rico en producción pesquera y sus costas la parte sur de la península de Baja California llegan a rendir capturas de 500 toneladas o más por viaje de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*), cuya carne es la de mayor valor para ser enlatada, comparada con las otras especies de atún (Soria, 1996).

Durante el procesamiento de este pescado se generan varias clases de desperdicios como lo son agallas y vísceras (material fresco) que se representan

entre un 4 y un 6 %; además las colas, espinas, piel y carne negra que es el material cocido de desperdicio se sitúa entre un 25 a un 28 %. A la llegada del pescado a tierra, este se congela a -20 °C para su posterior descongelación, proceso en el que llega a perderse el 1 % del peso total por pérdida de agua, el resto del peso de la captura, aproximadamente un 18 % lo constituye la fauna acompañante que en su mayoría es barrilete negro el cual se procesa como atún ahumado por ser de la misma familia. En el puerto de Mazatlán las plantas enlatadoras llegan a procesar volúmenes de hasta 120 toneladas por día (Ayala, 1995; Soria, 1996).

La producción de ensilaje constituye una interesante posibilidad para hacer uso del desperdicio de pescado generado en su procesamiento. (Gildberg, 1993; Aranson, 1994).

2- ANTECEDENTES

2.1 Industria atunera mexicana

2.1.1 Antecedentes de la pesca en México

Los primeros registros de la pesca en México se remontan al año de 1922, y es en 1929 cuando se crea la empacadora "El Sauzal" en Baja California. Ese año en todo el país se capturaron 3,000 toneladas de productos del mar (Páez, 1997).

En 1940 se capturaron 71,000 mil toneladas de las cuales 47,000 fueron capturadas por extranjeros y desembarcadas en California EUA; las embarcaciones nacionales aportaban el 34 % restante (24,000 tons.). El atún aportaba el 67 % de la captura, lo seguía el camarón (7 %), la sardina (7 %) y el 10 % restante lo componían cerca de 100 especies (Páez, 1997).

La industria atunera mexicana empieza a cobrar importancia a partir de 1971 y en abril de 1976 el número de embarcaciones atuneras era de 27 con una capacidad de acarreo de 11,075 toneladas, durante 1978 operaron 25 embarcaciones con una capacidad de 12 349 toneladas y se obtuvo una captura de 22,783 toneladas, para 1980 la flota mexicana obtuvo el mayor incremento en el número de embarcaciones que operaba en el océano Pacífico Oriental, la captura fue de 31,016 toneladas y en 1981 la actividad fue muy intensa lográndose una captura de 62,356 toneladas, de 1982 a 1983 el número de barcos y de capturas disminuyó por la crisis y el embargo impuesto por los EUA, lo cual redujo la captura a 36,734 en 1982 y a 27,000 en 1983. En 1984 la flota

mexicana compuesta de 48 barcos logró capturar 65,221 toneladas y durante 1989 la flota mexicana contó con 69 barcos que permitieron tener una capacidad de acarreo de 40,420 toneladas; en 1991 el desarrollo alcanzado hasta ese momento permitió a México que su flota figurara en el primer lugar entre las flotas que operaban en el océano Pacífico Oriental (Páez, 1997).

2.1.2 Liderazgo de la flota atunera mexicana en el océano Pacífico Oriental

Hasta 1983, la flota atunera de los Estados Unidos fue la mayor en el océano Pacífico Oriental en cuanto a número de embarcaciones y sobre todo a capacidad de acarreo, ya en 1987 tuvo que compartir ese liderazgo con la flota atunera mexicana para luego ser superada en 1989 y prácticamente desaparecer de esta zona en 1991 al trasladar la mayor parte de sus operaciones hacia el pacífico occidental (Samoa Americana, La Micronesia y la parte norte de Australia). En la tabla 1 se muestran las capturas por especies y países en el océano Pacífico Oriental en 1995 (Páez, 1997).

Ha existido una fuerte presión del gobierno de los EUA por la persistencia de los embargos desde 1990 y su ampliación desde 1992 a 20 naciones consideradas como intermediarios, pero gracias al continuo crecimiento del consumo interno y a cierta capacidad de diversificarse, la flota atunera mexicana sigue manteniendo su liderazgo en esta zona (Páez, 1997).

Tabla 1

Capturas por especies y países en el Océano Pacífico Oriental durante 1995

toneladas cortas*.

Pais	Aleta Amarilla	Barrilete	Patudo	Aleta Azul	Bonito	Albacor a	otras	Total	%
México	96651	34684	322	13	6998	--	29	141697	38.9
Venezuela	45244	3163	391	--	--	--		48798	13.4
Ecuador	18413	26055	4616	--	--	--	179	49263	13.5
Vanuatu	25114	11619	6640		--	--	--	43373	11.9
EUA	8793	12911	6241	520	11	532	25	29033	7.9
Colombia	12535	8208	2727	--	--	--	711	24177	6.6
Otros	6765	15088	5255	--	--	--	--	27108	7.4
Total	216514	111724	26192	533	7009	532	944	363448	100

Fuente. CIAT (comisión interamericana del Atún tropical) tercer informe trimestral, 1995. Citado por Páez 1997.

*Una tonelada corta equivale a 907 kg en Inglaterra y EUA (Martínez, 1997).

2.1.3 Importancia del atún aleta amarilla en las capturas de la flota mexicana

Aunque en el Océano Pacífico Oriental es posible capturar atún aleta amarilla, barrilete, bonito, patudo, aleta azul, albacora y otros, las capturas de la flota mexicana se han centrado en atún aleta amarilla, siguiendo el barrilete y el bonito. Es el atún aleta amarilla el que se asocia con delfines y para la captura del cual se utiliza el arte de pesca denominado de cerco; a diferencia de otros, esta técnica permite el mayor volumen de captura y atrapa atunes mas grandes y sexualmente maduros, el tamaño del atún es un factor importante en el rendimiento de las plantas enlatadoras. Atunes menores de 30 cm producen rendimientos del 38 % y los mayores de 120 permiten rendimientos de hasta el 50 % (Páez, 1997).

Como resultado de los embargos impuestos por los Estados Unidos a las importaciones de atún aleta amarilla procedentes de México, la flota atunera se ha visto obligada a diversificar las capturas, de 1990-1993 la participación de atún aleta amarilla en las capturas mexicanas en el Pacífico Oriental fue en promedio del 83.3 %, mientras que en 1994 y 1995 fue del 72 %. La principal especie después del atún es el barrilete que en 1995 representó el 24.4 % de la captura total y el bonito el 4.93 % (Páez, 1997).

2.1.4 Plantas procesadoras y comercialización

En términos generales, las mayores capturas de especies marinas son obtenidas en el Noroeste del país (Baja California Norte y Sur, Sonora y Sinaloa), representando estas en 1995 el 57 % del volumen total capturado y el 48.76 % del valor total; las capturas del estado de Sinaloa por sí solas representaron en ese año el 22.8 % del valor total (Anónimo, 1995).

A su vez, la industria atunera se ha concentrado también en el noroeste; el puerto de Ensenada ha sido considerado la cuna de esta industria y constituyó el centro atunero más importante de México durante varios años. Entre 1979-1984 esta zona presentó una disminución del 27 % de su participación en la producción nacional (Anónimo, 1995).

En 1986 la industria atunera se localizó en un 45 % en Ensenada e isla de Cobos, 3 % en Sonora y 24 % en Mazatlán, Sinaloa. Ese año existían en el golfo de México y mar del Caribe dos pequeñas enlatadoras. Desde entonces la distribución de las plantas y sobre todo su capacidad instalada y utilizada ha cambiado de manera significativa. En Ensenada algunas plantas han cerrado, en tanto que en Mazatlán ha tendido a concentrarse la mayor capacidad productiva (Páez, 1997).

En 1990 el valor de la pesca mundial de atunes fue cercano a 4000 millones de dólares, siendo en valor, la segunda pesquería después de la del camarón.

En México de noviembre a octubre de 1992 el volumen de productos del mar comercializados ascendió a 836,202 toneladas métricas, destinándose

701,884 al abasto interno y 134,318 a exportación (83.9 y 16.1 % respectivamente). Los ingresos totales fueron de 426 millones de dólares. Los productos con mayor participación en valor fueron el camarón 60.6 %, túnidos 9.5 %, abulón 7.6 % algas y zargazos con el 5.5 %. En cuanto a consumo de atún, México ocupa el 5° lugar en consumo latas /per cápita con 4.89 después de Japón y el 4° lugar en consumo nacional de toneladas, esto según un estudio llevado a cabo en 1992 por la Cámara Nacional de la Industria Pesquera (Páez, 1997).

A partir de los embargos de 1980 y 1981 incrementaron las exportaciones de túnidos hacia los mercados de Europa y Japón las que contribuyen de manera importante. De esta manera el fin de la década de los 80's fue también la conclusión de las exportaciones mexicanas de atún hacia el mercado de EUA, pero generó temores entre armadores de barcos y procesadores quienes recurrieron en los 90's y en el marco del tratado de libre comercio de América del Norte al proteccionismo bajo novedosas modalidades ecológicas (Páez, 1997). En 1998 el embargo atunero está en vías de ser levantado nuevamente, ofreciendo un panorama muy alentador para esta industria.

Con el levantamiento del embargo atunero, se pretende que el pescado chico se procese para consumo interno, lo cual exige que se optimice la utilización de los subproductos, ya que el pescado chico tiene bajo rendimiento, por otro lado, la contaminación generada en las plantas harineras exige la búsqueda de formas alternativas que además tengan un bajo costo de inversión para el procesamiento de subproductos (Ayala, 1995; Soria, 1996).

2.2 Métodos de producción del ensilaje

La producción de ensilaje es un proceso relativamente simple y barato, el material utilizado puede ser desde fauna acompañante o subproductos del procesamiento, vísceras y otros, los cuales, son molidos antes de la adición de ácidos, las enzimas presentes en el material hidrolizan la masa para formar un producto líquido estable con buenas características de almacenamiento. La calidad del ensilaje va a depender de la calidad de la materia prima (Raa y Gildberg, 1982).

La primera etapa del proceso lo constituye la molienda y homogeneización, tratando de que el tamaño de partícula tenga aproximadamente entre 3-4 mm de diámetro, esto es con el fin de que la distribución de las enzimas y del ácido sea lo mas homogénea posible (Aranson, 1994), de no ser así se puede ocasionar putrefacción si el pH de esa zona no es lo suficientemente bajo para inhibir el crecimiento de microorganismos (Pérez, 1995).

La segunda etapa es la adición de ácidos estos pueden ser orgánicos, inorgánicos o una mezcla de ambos, la cantidad de ácidos va a depender de la cantidad de cenizas presentes en el material. Se han realizado algunos trabajos utilizando distintos tipos de ácidos, muchos de los cuales usaron fórmico como único ácido (Tatterson y Windsor, 1974; Backhoff, 1976) para elaborar ensilajes de bacalao, gastando un volumen de 3 % v/p, e incubando a temperaturas de 2° C y 23°C, la principal ventaja de esto es que el pH requerido para preservar es de 4 lo cual no es tan bajo como para necesitar ser neutralizado antes de incluirse en

dietas para animales, además de que por ser un ácido orgánico no es corrosivo y es mas seguro de manejarse, sin embargo el inconveniente es su costo (Tatterson y Windsor, 1974).

Aunque el ensilaje ácido ha sido el mas comúnmente usado, se ha tratado de desarrollar otros métodos con algunas variantes, en Islandia se ha intentado preservar la víscera bajo condiciones alcalinas utilizando amoniaco, obteniendo buenos resultados, sin embargo existe la posibilidad de que en condiciones alcalinas se dañen importantes aminoácidos disminuyendo su calidad nutricia y además es peligroso por la formación de lisinoalanina, un aminoácido que causa envenenamiento en animales (Raa y Gildberg, 1982; Belitz, 1992).

En Estados Unidos se obtuvo proteína de pescado en licuefacción, disminuyendo la cantidad del ácido empleado a solo 0.5 % v/p, el material se mantuvo en constante agitación a una temperatura de 50 °C durante 2 horas, al final de esto el material se tamizó para separar las partes sólidas, sin embargo la estabilidad microbiológica no fue evaluada (Verburg y Freeman, 1984).

Los hidrolizados que se obtienen utilizando enzimas añadidas, se han desarrollado en Francia y en Estados Unidos, en este caso las proteasas hidrolizan las proteínas del pescado propiciándoles sus condiciones óptimas de actividad de tal manera que la hidrólisis se realiza en pocas horas, y el material no hidrolizado como los huesos y la piel, es separado, lo mismo que la grasa, posteriormente este material es concentrado por aspersion hasta obtener un polvo que puede ser utilizado como sustituto de leche. Comparado con la producción de ensilaje de pescado, la producción de hidrolizados es mas complicado puesto que

requiere de un mayor costo de inversión y de un control mas exacto (Macky, 1982; Merrit, 1982; Aranson, 1994).

Gildberg y Raa (1977) propusieron el uso de la mezcla ac. fórmico + ac. propiónico usando 0.75 % v/p de cada uno y lo utilizaron para ensilar víscera de bacalao, el producto fue mezclado con paja de cebada en proporción 2:1 (ensilaje:cebada), el pH fue de 4.5 y el producto fue estable por más de un año a 20°C. Encontraron que el mismo material, utilizando solo ácido fórmico no fue tan estable, pues presentó contaminación por hongos.

Rungruangsak y Utne (1981) probaron el efecto que tenían el ácido empleado en el ensilaje sobre la actividad proteolítica en el tracto digestivo de la trucha arco iris. Ellos elaboraron ensilajes con ácido fórmico, clorhídrico y sulfúrico. El ácido clorhídrico y ácido sulfúrico no mostraron ningún efecto sobre la actividad proteolítica en ninguna parte del tracto digestivo, a diferencia del ácido fórmico que si la disminuía.

Viana y cols. (1993) ensilaron macarela sin cabeza con dos mezclas diferentes de ácido: sulfúrico+acético y fosfórico+citríco, el pH se mantuvo estable durante 90 días, sin embargo, después de 60 días empezó un incremento de bases volátiles. En otros trabajos donde se ha utilizado solamente ácido acético glacial para preservar desperdicio de cangrejo se ha visto que el gasto es de 16 % v/p, el producto obtenido se mezcló con paja resultando en un producto palatable y digestible cuando se utilizó en rumiantes (Samuels y cols., 1991).

Los iones hidrógeno (protones) pueden atravesar el interior de las células cuando se utiliza un ácido orgánico. Los ácidos orgánicos débiles tienen una

relativa baja ionización a bajo pH y pueden pasar libremente a través de las membranas celulares. En el interior de las células donde el pH es neutro, los ácidos orgánicos se ionizan gradualmente ocasionando la disminución del pH y la acumulación de aniones. Estos factores contribuyen al efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos débiles. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se incrementa cuando el pH del ensilaje cae dentro del valor de pKa del ácido orgánico, por ejemplo se recomienda que el pH del ensilaje sea de 3.75 y 4.8 para ensilajes de ac. fórmico y propiónico respectivamente para que tengan menos del 50 % de su concentración en la forma disociada antimicrobiana (Lall, 1991).

El ensilaje gradualmente se licúa debido a la actividad de las enzimas sobre el tejido, las cuales se encuentran naturalmente presentes, en el pescado, y presentan un pH de actividad óptimo de entre 2-4 (Gildberg, 1993).

En un ensilaje aproximadamente, el 80 % del nitrógeno total se encuentra como aminoácidos libres después de una semana a una temperatura de 20°C a 30°C (Backhoff, 1976), sin embargo la velocidad de la hidrólisis dependerá del estado de las enzimas, temperatura de incubación, pH y composición del material así como de la homogeneización que se le da durante la etapa de incubación. Finalmente el ensilaje puede ser almacenado por periodos prolongados debido al efecto de los ácidos. Una vez que se tiene reunido todo el equipo necesario para este proceso, su producción puede resultar muy económica (Aranson, 1994).

2.3 Composición del ensilaje

El ensilaje de pescado se prepara a partir de pescado entero o partes del mismo, incluyendo se las enzimas presentes en el material como lo son las enzimas contenidas en las vísceras, el material se acidifica y se almacena de tal manera el el pH de entre 2-4, facilita la acción de las proteasas a la vez que impide que el producto sea descompuesto por acción bacteriana.

Considerando esta definición la composición del ensilaje dependerá de los materiales a partir de los cuales se preparó; en el caso del músculo de pescado, este se caracteriza por contener un elevado contenido de nitrógeno no proteínico (NNP), el cual incluye principalmente aminoácidos libres, óxido de trimetilamina (OTMA) que se reduce a trimetilamina (TMA) después de la muerte, y nitrógeno volátil particularmente amoniaco. El OTMA se encuentra en cantidades considerables en peces marinos especialmente en elasmobranquios. En el pez vivo existe un equilibrio entre el OTMA y la TMA; después de la muerte se presentan cambios bioquímicos en el tejido lo que ocasiona un incremento en dimetilamina (DMA) y TMA. Los peces elasmobranquios se caracterizan por su elevado contenido de OTMA, sin embargo algunos peces migratorios como es el caso del atún poseen cantidades considerables de músculo oscuro en el cual la concentración de OTMA es elevada. La TMA ha sido considerada de manera general como un indicador de la acción reductora bacteriana y es importante mencionar que solamente el músculo pigmentado de rojo (oscuro) tiene la

habilidad de reducir el OTMA de forma similar a la oxido trimetilamina reductasa de origen bacteriano (Borgstrom 1961).

La formación de DMA y formaldehído se da por acción de la enzima óxido trimetilamina dimetilasa. La producción de formaldehído en el músculo del pescado en condiciones de refrigeración se ha relacionado con la causa de la textura esponjosa que lo hace inaceptable (Soliman y Shenouda 1980, Hui 1992).

Los peces presentan distintos tipos de musculatura dependiendo de su vida acuática, presentando un músculo lateral rojo empleado para movimientos de larga duración y músculo claro para periodos de ejercicio intenso por tiempos cortos; este tipo de músculos tienen distintas enzimas y además difieren en su contenido de lípidos, siendo mayor en el músculo oscuro, así mismo presenta un mayor contenido de mioglobina por su mayor grado de vascularización, ya que estos músculos están diseñados para el metabolismo oxidativo (Fennema 1993, Macrae y cols. 1993).

El ensilaje ácido de pescado es un producto relativamente estable desde punto de vista microbiológico, sin embargo las enzimas presentes en el material producen ciertos cambios cuando la autólisis se deja continuar; el porcentaje de nitrógeno de los aminoácidos libres aumenta mientras que el de los polipéptidos disminuye. El nitrógeno volátil total del ensilaje de pescado puede alcanzar valores de 110 mg NH_3 /100 g de muestra principalmente debido a la descomposición de los aminoácidos glutamina y asparagina. Aunque la concentración de TMA no varía durante el proceso del ensilaje si éste se ha preservado correctamente, se recomienda su utilización para control de calidad

del la materia prima, ya que la dificultad para estandarizarla es una de las razones del lento crecimiento de esta industria pues de esto depende en gran medida la calidad del producto final (Haaland y Njaa 1989, Aranson 1994).

Aunque el atún es considerado un pez bajo en contenido de lípidos, en el músculo blanco este va de 1.6 hasta 4.1 % dependiendo de variaciones de la temperatura y predominan los ácido grasos poliinsaturados de cadena larga, además son ricas fuentes de vitaminas liposolubles, aunque la mayoría son removidas con la víscera, sin embargo estas pueden ser presas de la oxidación cuando se maneja el pescado de manera inadecuada. Los procesos oxidativos son de gran importancia por la toxicidad de los hidroperóxidos que son altamente reactivos. El material lipídico constituye además una fuente concentrada de energía y contribuye a los requerimientos esenciales de ácidos grasos. Estudios recientes muestran la utilidad del aceite de pescado como fuente de ácidos grasos, por lo que se ha incrementado el interés por este subproducto de las operaciones de procesamiento (Macrae y cols. 1993).

En lo que respecta al contenido visceral además de ser una buena fuente de vitaminas y aceite, también contiene una variedad de enzimas como la pepsina cuyo pH óptimo de actividad fluctúa de 2-4. La mucosa intestinal es una fuente de lipasas y las secreciones intestinales incluyen proteasas como la tripsina, en esta porción los pH son alcalinos, la acción de las lipasas incrementan la formación de ácidos grasos libres lo cual se ha relacionado, aunque no de manera concreta, con la oxidación de los lípidos; además, en los intestinos de pescado son abundantes las vesículas conteniendo sangre, la hemoglobina de la sangre

contribuye además a la oxidación de lípidos por la acción del hierro en la formación de radicales libres (Hui 1992).

Considerando estos factores como son presencia de enzimas proteolíticas y el contenido de lípidos es fácil comprender que la oxidación y la proteólisis enzimática son los principales cambios que ocurren en ensilajes de pescado, lo cual puede afectar su utilidad como fuente de alimento, sin embargo existen trabajos al respecto con muy buenos resultados.

2.4 Cambios químicos que ocurren en el ensilaje

2.4.1 Nitrógeno no proteínico y actividad proteolítica

El mayor cambio que ocurre en el ensilaje es la licuefacción de la masa, principalmente consecuencia de las enzimas proteolíticas presentes en el material, las cuales, además liberan agua lo que favorece la pérdida de consistencia. Esta hidrólisis ocasiona la formación de nitrógeno no proteínico, que está compuesto de aminoácidos libres, péptidos y bases volátiles; en mayor cantidad se encuentran amoníaco y trimetilamina. La velocidad de proteólisis durante las primeras 24 horas es mas alta, dentro de los primeros 3 días se puede alcanzar hasta el 50 % del nitrógeno no proteínico, respecto al nitrógeno total (Backhoff, 1976).

La autólisis produce una separación de fases, una fase lipídica, una fase hidrosoluble la cual contiene alta concentración de proteína y muy poca grasa y un sedimento insoluble que contiene proteína y lípidos. La composición de aminoácidos de la fase soluble difiere marcadamente de la composición del sedimento ya que en este último la hidroxiprolina se encuentra en cantidades relativamente bajas comparadas con las que hay en la fase hidrosoluble; en cambio el sedimento presenta mayores cantidades de aminoácidos aromáticos como son tirosina y fenilalanina. El sedimento que queda después de varios días de ensilaje, es muy resistente a la actividad proteolítica de las enzimas de la

viscera, aún cuando este se someta a la acción de enzimas de una viscera fresca (Raa y Gildberg, 1976).

Con relación al triptofano, Backhoff (1976), al elaborar ensilajes de viscera de bacalao a pH de 3.9 y a 15°C, encontró pérdidas de 20 % después de 54 días de almacenaje.

Otro de los cambios relacionados al ensilaje es la pérdida de tiamina presente en la materia prima, Anglesea y Jackson (1985) encontraron que la actividad tiaminasa presentaba su actividad óptima a pH de 6.4 y otro pico de actividad aunque menor a pH de 4.5, encontraron además que ésta tiende a disminuir posiblemente como consecuencia de la acción de las proteasas sobre las tiaminasas.

A pesar de que se ha observado que los hidrolizados proteínicos presentan sabores amargos se ha encontrado que los hidrolizados de pescado, relativamente son menos amargos que los hidrolizados de proteínas de leche por ejemplo, lo cual hace pensar que esto es consecuencia de péptidos pequeños en los que predominan los restos hidrófobos (Ritchie y Macki, 1982), por otro lado algunas especies animales como las aves, son poco selectivas a los sabores del alimento (Bigueras-Benitez y Nacorda, 1992).

En algunos trabajos se ha estudiado la capacidad de hidrólisis de las distintas enzimas presentes en ensilajes elaborados de vísceras y cabezas de pescado blanco (*Gadus merlangus*), esto se realizó preparando ensilajes con distinto grado de acidificación, en un ensilaje preparado de manera convencional (pH=4) se observó que de 3 a 7 días, el porcentaje de nitrógeno de aminoácidos

libres aumentó hasta más de un 70 % (del nitrógeno total), en otro ensilaje que se había acidificado a pH=2 se observó que la hidrólisis fue más limitada, la cual solo llegó a un 50 % y manteniéndose casi sin cambio durante 6 semanas, esto fue atribuido a que a este pH posiblemente la única enzima responsable de la hidrólisis era la pepsina (Stone y Hardy, 1986).

En otro estudio, realizado también con ensilajes de pescado blanco en los que se proponía el ensilaje para formular dietas para trucha arco iris, se observó que en los primeros días hay una acelerada acumulación de aminoácidos libres y que los aminoácidos esenciales son liberados más rápidamente que los no esenciales, resultando en una relación de esenciales/no esenciales de 1.38, comparada con 0.78 que presentaba al inicio la materia prima (Stone y cols., 1989).

En el sistema digestivo de los rumiantes se considera que la rápida liberación de amoníaco reduce el valor nutritivo de una proteína, debido a la baja eficiencia que tienen los microorganismos del rumen para capturar el amoníaco, por esta razón se ha evaluado el efecto del formaldehído sobre el ensilaje de pescado; en relación a la producción de amoníaco. Husain y Offer, (1987) observaron que la adición de formaldehído limitaba la hidrólisis lo cual se explicó por un posible efecto de éste, sobre las enzimas proteolíticas. Cuando evaluaron la producción in vitro de amoníaco en líquido ruminal se encontró que esta fue también reducida, de lo cual se considera que el tratamiento con formaldehído en el ensilaje mejora su utilización por las bacterias del rumen. Trabajos similares habían sido obtenidos por Haard y cols. (1985).

2.4.2 Formación de bases volátiles

En macarela y capelin almacenados entre 5 y 7 °C sin preservativos se observa que el nitrógeno amídico disminuyó, pero no en la misma proporción en que el nitrógeno del amoniaco se incrementaba, indicando que el nitrógeno amídico puede ser una importante fuente para la producción de amoniaco, pero no la única si el pescado no se había preservado adecuadamente. Cuando estos pescados se encontraban preservados con formalina o con antibióticos, así como en forma de ensilajes elaborados con ácido fórmico (2.2 % v/p), se observa que el nitrógeno volátil total (NVT) y el amoniaco incrementaron con el tiempo, pero el nitrógeno amídico disminuyó en la misma proporción que el nitrógeno del amoniaco aumentaba, lo cual sugiere que el nitrógeno amídico es la principal fuente de nitrógeno para la formación de amoniaco en pescado preservado. Estos conservadores previnieron la formación de TMA. Cuando se le adicionaron al ensilaje distintos aminoácido en forma libre, se observó que la glutamina causó el mayor incremento en los valores de amoniaco ya que el grupo amídico de la glutamina libre es muy lábil, por lo que en ensilajes bien preservados, el nitrógeno amídico de glutamina y en menor grado el de asparagina resultan ser importantes fuentes de amoniaco, sin embargo estos aminoácidos se consideran dispensables para ratas (Haaland y Njaa, 1988) y pollos (Scott y cols., 1982; NRC 1994).

Si la acidificación no fue suficiente, el pH tiende a incrementarse resultando en una mayor producción de amoniaco que en ensilajes con un pH estable bajo,

además se observa que el contenido de arginina y de tirosina tiende a disminuir, por otro lado en ensilajes mal preservados se observa que el NVT incrementa más que NH_3 lo cual se explica por la producción de TMA (Haaland y Njaa, 1989).

En algunos trabajos en los que se ha comparado a los ensilajes de sardina preservados químicamente con ácido fórmico y los ensilajes fermentados, preparados con melaza y un inóculo de *Lactobacillus plantarum*, se ha observado que en el ensilaje ácido el pH tiende a mantenerse estable y bajo (pH=4) mientras que en el ensilaje fermentado el pH de un valor inicial de 6 tiende a bajar a 4.25 dentro de los primeros 3 días, después de 7 días se mantuvo constante con ligeros incrementos para estabilizarse en pH 5 después de 30 días (Zuberi y cols., 1992).

La producción de TMA y bases volátiles en el ensilaje fermentado fue mayor comparado con el ensilaje ácido, la TMA incrementó de un valor inicial de materia prima de 0.95 mg/100 g a 7.8 mg/100 g en el ensilaje ácido, mientras que el ensilaje fermentado alcanzó valores de hasta 22.5 mg/100 g de muestra, esto durante un año, en el caso de las bases volátiles los valores de la materia prima fueron de 13.2 mg/100g y al cabo de un año fueron de 50.2 mg/100 g y de 925.5 mg/100 mg en los ensilajes ácido y fermentado respectivamente. Estos valores altos fueron atribuidos a los incrementos de NH_3 que para el ensilaje ácido fueron de 1.8 % en un año mientras que para el ensilaje fermentado fue de 37 %, esta diferencia se ha explicado por el hecho de que posiblemente las bacterias ácido lácticas utilicen algunos aminoácidos como fuente de energía. A pesar de esto se

ha reportado que en ensilajes fermentados el aroma es agradable incluso mas suave que en ensilajes ácidos (Zuberi y cols., 1992).

Sin embargo otros trabajos en los que se ensiló por vía fermentativa una mezcla 1:1 de subproducto de cangrejo con paja de trigo usando 20 % melaza e inóculo de *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus faecium*, se encontró que la trimetilamina, la cual es la responsable del olor ofensivo en los productos marinos fue baja, de hecho no hubo cambios notorios respecto al estado inicial (7-8 mg/100g de ensilaje), en este caso se ha sugerido que en los ensilajes fermentados con ausencia de azúcar libre, los microorganismos actúan rápidamente sobre las proteínas, resultando en la producción de aminas. Se ha sugerido que en animales marinos incluyendo cangrejos, el óxido de trimetilamina el cual actúa como un aceptor terminal de electrones es reducido por acción bacteriana a TMA en ausencia de apropiadas sustancias tales como piruvato y glucosa. Esto además se corrobora porque al utilizar 10 % en vez de 20 % de melaza, los valores de TMA pasaron de 7.32 a 16.84 mg/100 g (Abazinge y cols., 1993)

Por otro lado se ha visto que en el ensilaje ácido la cuenta bacteriana disminuye, mientras que en el ensilaje fermentado aumenta, lo cual se debe a la presencia de bacterias ácido lácticas previamente inoculadas (Zuberi y cols. 1992). Dong y cols ,(1993) encontraron que la cuenta de mesófilos aerobios en el ensilaje ácido después de 14 días fue de 10 UFC/g, cuando el material inicial (víscera antes de ensilar) había presentado 10^4 UFC/g.

2.4.3 Cambios relacionados con el aceite

El contenido de ácidos grasos del aceite de pescado es una medida del grado en que los glicéridos en el aceite se han descompuesto, este es el criterio para juzgar el aceite para propósitos comerciales, para aceites de buena calidad el nivel de ácidos grasos libres se considera que debe ser menor del 3 % por peso (expresado como ácido oleico), se ha sugerido que para obtener un buen aceite del ensilaje, este debe ser extraído lo mas pronto posible para evitar el aumento de ácidos grasos libres (Reece, 1980), los que se consideran, pueden oxidarse mas rápidamente que los glicéridos originales.

Reece (1980) evaluó la formación de ácidos grasos libres en ensilajes de sardinetas (*Sprattus sprattus*) un pescado considerado graso, para lo cual midió la actividad lipolítica y el efecto que sobre ésta tenían algunas variables, encontrando que inmediatamente después de la acidificación los ácidos grasos libres aumentan, el incremento en los ácidos del aceite extraído fue explicado por la liberación de sus sales solubles en agua cuando el pH se reduce. La actividad lipolítica se observó que era óptima a un pH de 4.6. Cuando el material había sido previamente calentado la actividad lipolítica era inhibida, y la producción de ácidos grasos libres era de tipo química pues se observa un ligero aumento al disminuir el pH por debajo del óptimo de la enzima. El grado de hidrólisis de la proteína influye también en la cantidad de extracción del aceite por centrifugación ya que a menor proteólisis el aceite extraído contiene, menos ácidos grasos libres lo cual sugiere que estos permanecen unidos al sedimento. La temperatura

aumenta la hidrólisis del aceite, tanto enzimática como química, siendo óptima para la enzimática de 25-30 °C. Recce (1980), recomienda utilizar 3 % de la mezcla sulfúrico + fórmico (mezcla: 1 parte de fórmico al 85 % + 2 partes de sulfúrico al 50 %), la cual proporciona una alternativa económica que produce un pH inicial de 2, el cual llega a incrementar a 3 siendo adecuado para consumo de animales sin requerir de neutralización.

En otros trabajos se ha observado que la remoción del tracto digestivo del pescado reduce el contenido de ácidos grasos libres comparado a cuando se utiliza el pescado completo, esto se vió en un ensilaje de macarela, indicando que el contenido inicial de ácidos grasos en el tracto digestivo antes del ensilaje ya era alto, por otro lado al ensilar una parte del músculo, hígado y gónadas se obtuvo un producto con un aceite mucho menos oscuro que cuando se ensiló el pescado completo, un posterior estudio reveló que el remover la sangre del pescado antes de la acidificación resultó en un decremento de la pigmentación del aceite durante el ensilaje, esto hace pensar que es la hemina (producto de la hidrólisis ácida de la hemoglobina) la responsable del oscurecimiento del aceite, éste compuesto también cataliza la formación de peróxidos por la presencia del hierro. En especies pelágicas donde el contenido de sangre es elevado la pigmentación oscura del aceite resulta obvia. En este mismo trabajo se evaluó el efecto del peróxido de hidrógeno para aclarar el aceite así como el efecto del butil hidroxitolueno para controlar la oxidación obteniéndose buenos resultados (Reece, 1981).

El aceite del ensilaje de pescado puede oxidarse haciendo inaceptable o inseguro para los animales, sin embargo si el aceite se obtiene por centrifugación podría ser un subproducto de valor, los ensilajes grasos son deseables para su utilización en dietas para animales de piel y para peces y son una fuente atractiva de energía metabolizable (Haard y cols., 1985).

Algunos antioxidantes como el etoxiquín y el butil hidroxitolueno pueden ser utilizados para evitar la oxidación, sin embargo permanece el riesgo de que la carne del animal se impregne de sabor, este problema puede ser evitado si se omite el aceite de pescado de las dietas durante las últimas etapas de alimentación, con adecuada anticipación al sacrificio (Haard y cols., 1985).

El formaldehído controla la autólisis, además resultó ser efectivo para prevenir la oxidación, manteniendo el número de ácido tiobarbitúrico por abajo de 2 mg de malonaldehído/kg, además controló olores desagradables y la producción de bases volátiles totales, sin embargo el formaldehído no previene la hidrólisis de lípidos, el producto fue utilizado en rumiantes y tuvo buena aceptabilidad (Haard y cols., 1985).

Dong y colaboradores (1993), elaboraron ensilajes de víscera de salmón, tanto fermentado como acidificado con H_2SO_4 , en este trabajo a la víscera recién extraída se le añadieron 150 ppm tanto de BHT (Butil hidroxitolueno) como de BHA (butil hidroxianisol) y luego se mantuvieron a $-35\text{ }^\circ\text{C}$ hasta que se elaboraron los ensilajes. Antes de que los ensilajes fueran secados se les añadió 0.05 % de etoxiquín, los niveles de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se mantuvieron bajos en ambos ensilajes.

En otros trabajos, el etoxiquín, fue capaz de mantener los valores de peróxidos bajos (3.9 meq/kg) comparados con los valores de peróxidos encontrados en los ensilajes que no habían sido tratados con el antioxidante (182.4 meq/kg), en este mismo trabajo se estudió el efecto que tuvieron los distintos tratamientos en la velocidad de crecimiento de salmones, se encontró que ésta solo fue ligeramente reducida en la etapa final del experimento en el caso de ensilajes rancios, pero ambos tratamientos arrojaron resultados similares al control sin ensilaje (Jackson, 1984b).

2.5 Valor nutricional del ensilaje

En varios trabajos se ha podido utilizar exitosamente el ensilaje de pescado, demostrando que puede ser una buena fuente de proteína y que su valor nutricional es comparable al de la harina de pescado (Aranson, 1994). El proceso del ensilaje y su correspondiente autólisis no altera la composición de aminoácidos de manera significativa, hay trabajos sin embargo en los que se ha encontrado que el triptófano por ser inestable en condiciones ácidas es el primer aminoácido limitante del ensilaje (Backhoff, 1976). Pero en una dieta para animales el nivel de triptófano puede ser mejorado por adición de proteína de algún cereal (Aranson, 1994).

En pruebas de alimentación con trucha arco iris en el que se evaluó un ensilaje de pescado blanco elaborado con ácido sulfúrico (2% p/p) y ácido propiónico (0.75% v/p), se encontró que si el ensilaje se dejaba hidrolizar durante 20 días alcanzando un nivel de nitrógeno no proteínico de 79 % del nitrógeno total, se observaba depresión del crecimiento y conversión alimenticia, pero si el ensilaje se dejaba únicamente durante 3 días (50 % de nitrógeno no proteínico) o 6 días (59 %), no se observaba ningún efecto sobre estos parámetros respecto a la dieta control, durante 12 semanas de alimentación (Hardy cols., 1984).

El ensilaje de pescado puede ser secado añadiendo algún componente seco para que sirva de soporte, de esta forma el ensilaje es absorbido, este procedimiento posibilita que se ajuste la composición final y el valor nutricional del producto, variando la combinación y proporción de los ingredientes, este tipo de

estudios fueron llevados a cabo por Hardy y colaboradores (1984), quienes substituyeron 25 % de harina de pescado con ensilaje de pescado blanco el cual había sido secado con harina de soya y harina de plumas, los resultados mostraron ganancias en peso similares al control empleado, que en este caso había sido harina de pescado.

Se ha evaluado también el efecto que ocasiona un ensilaje si este contiene su aceite oxidado, Jackson y cols., (1984a) llevó a cabo un estudio elaborando dos lotes de ensilaje de pescado graso (*Sprattus sprattus*), uno de los cuales había sido tratado previamente con etoxiquín como antioxidante, los resultados obtenidos después de evaluar el producto en salmones demostraron que no hubo diferencia significativa en los pesos finales, aunque causó depresión en la etapa final, la conversión alimenticia tampoco tuvo diferencia significativa (Jackson, 1984b), en este trabajo se demostró que la oxidación del aceite se puede controlar con antioxidantes y además que la naturaleza ácida del producto no interfiere con la palatabilidad.

A pesar de los trabajos de Rungrungsak y Utne (1981) en los que encontraron que el ácido fórmico podía inducir cierta depresión de la actividad proteolítica en el tracto digestivo de salmones, Wood y cols. (1985) demostraron en experimentos con carpa, que dicha depresión no se encontró y además se ha observado que la disminución de crecimiento puede ser debido a la pobre estabilidad del peletizado al agua mas que debido a la composición del ensilaje, por lo que si se elaboran peletizados con buena estabilidad los resultados obtenidos son favorables (Jackson, 1984b).

En trabajos realizados con tilapia, se estudió cual era el nivel de inclusión óptimo de ensilaje el cual había sido elaborado con subproducto del procesamiento de sardina. los resultados indicaron que si se mezclaba harina de pescado con ensilaje en proporción 1:1, se obtenían respuestas similares a la dieta control en relación a la ganancia en peso y porcentaje de peso ganado, cuando la harina y el ensilaje se mezclaban en proporción 1:2 el crecimiento se disminuía con respecto a las otras dos dietas, pero por otro lado el valor de la relación de eficiencia proteínica se mejoraba en la dieta cuya proporción era 1:1 respecto a las otras dos dietas. La utilización neta de proteína también resultó significativamente mejor en la dieta de proporción 1:1 que en la dieta de harina de pescado sola y la dieta de la proporción 1:2 de harina:ensilaje (Lapie y Bigueras-Benitez, 1992).

Heras y cols. (1994) compararon ensilajes elaborados de arenque y bacalao en dietas para salmón, aunque los resultados no presentaron diferencias significativas, se observó que los salmones que recibieron dietas con ensilajes de bacalao presentaron un mejor crecimiento que los de ensilaje de arenque a pesar del alto contenido de urea, lo cual se pensó que podía afectar la palatabilidad, por otro lado el contenido de urea en el músculo del salmón alimentado con dietas de ensilaje de bacalao no presentó diferencias significativas con los salmones alimentados con arenque, estos resultados proponen el ensilaje de bacalao como un proceso que además de reducir la contaminación generada por los desperdicios de bacalao se pueden elaborar dietas adecuadas para salmón.

En cuanto a la evaluación del ensilaje de pescado en pollos algunos trabajos se han realizado. Johnson y cols. (1985), realizaron un experimento para comparar el ensilaje obtenido tanto por vía fermentativa como por vía ácida, se compararon además frente a 2 dietas controles en una de las cuales la soya aportaba la mayor parte de la proteína, mientras que en el otro control, el principal aportador de proteína era harina de pescado, los niveles de inclusión de los ensilajes eran de 2.5, 5 y 10 % en el alimento. Los resultados mostraron que no hubo diferencia significativa respecto a los controles en relación a la ganancia en peso y conversión alimenticia, sin embargo se observó que en el ensilaje fermentado la cantidad de proteína cruda y aminoácidos fue ligeramente menor, lo cual se atribuyó a posibles reacciones de Maillard durante el secado, pues se había utilizado melaza de caña como fuente de carbohidratos fermentables, tampoco hubo diferencia sensorial en la canal de los pollos al final del experimento en ninguna de las dietas al final del experimento (42 días).

Bigueras-Benitez y Nacorda (1992) realizaron trabajos similares en pollos de engorda, ellos encontraron que aunque la ganancia en peso fue menor en los pollos alimentados con ensilaje fermentado, la eficiencia de la conversión fue comparable, sin embargo un desbalance de minerales causó problemas en las piernas y en el desarrollo de plumas. En este trabajo se demostró además que la utilización de sorgo como vehículo de secado es eficiente aún cuando el secado se realice al sol.

Resultados bastante satisfactorios han mostrado que el ensilado de pescado puede ser incluido en raciones para pollos de engorda en niveles de

hasta el 30 % en base húmeda, obteniendo muy buena respuesta animal en cuanto a la aceptabilidad del alimento pues su consumo se mejora, se encontró además que niveles de sustitución superiores del 50 % ocasionan disminución del consumo. Por otro lado, al sustituir 30 % se mejora el consumo aunque no de manera significativa respecto a la dieta basal. La conversión alimenticia no se altera e incluso se observó que cuando se utiliza el 5 % de inclusión de ensilaje esta era ligeramente mejor que la dieta basal, por otro lado el producto resultó inocuo, como lo mostró el estudio de órganos después del sacrificio, además niveles de 20 % de inclusión no impregnan la carne de pollo con el sabor a pescado (Bello y Fernández 1995).

2.6 Otras aplicaciones de los ensilajes

Algunos trabajos han sido desarrollados con ensilajes, encontrando que este producto puede ser utilizado para otros fines, dentro del área de los alimentos a parte de la alimentación animal.

Torrinsen y cols. (1981) ensilaron subproductos del procesamiento del camarón, utilizando una mezcla de 4.8 % v/p de ácido sulfúrico (al 50 % v/v) y 1.2 % v/p de ácido propiónico, el pH se ajustó a 4. Ellos encontraron que la astaxantina resultó estable en el ensilaje, la extracción de la astaxantina se realizó después de un proceso de centrifugación ya que en el sedimento se encontraba el pigmento, además a mayor hidrólisis menor era el tamaño del sedimento y mayor era la concentración relativa de la astaxantina, lo cual fue resultado de la solubilización de las estructuras cálcicas del caparazón del camarón durante el ensilaje. Cuando este ensilaje se probó en dietas para trucha arco iris usando un control de harina de subproducto de camarón obtenido por el tratamiento convencional, se encontró que la digestibilidad de la astaxantina había sido mejorada: 71 % en el ensilaje comparado con 45 % en la harina. Posteriores estudios (Guillow y cols., 1995) utilizando estos mismos materiales con antioxidantes probaron que aún después de 3 meses de almacenamiento la astaxantina y el contenido de ácidos grasos polinsaturados se mantenían estables.

Stone y colaboradores (1984) elaboraron un ensilaje de pescado blanco entero, utilizando 2 % de ácido sulfúrico y 0.75 % de ácido propiónico, luego se

mezcló con harina de canola y afrecho de trigo para formar un producto tipo pasta, estabilizado por ácido y fue almacenado a 20-22°C. Durante el periodo de almacenamiento el ácido fítico de la harina de canola fue desfosforilado por las fitasas presentes en el afrecho de trigo. Se observaron cambios en el nitrógeno no proteínico del pescado, pero además se encontró que las proteasas del pescado habían hidrolizado parcialmente la proteína tanto de la canola como del afrecho. El producto resultante pudo ser almacenado a temperatura ambiente sin daños y el secado se facilitó notablemente gracias a la consistencia pastosa. Este proceso constituye una forma de mejorar el valor nutricional de la harina de canola reduciendo su alto contenido en fitatos.

Uno de los productos que también es posible extraer de los desperdicios de pescado son las enzimas de las vísceras. La obtención de proteasas a partir del ensilaje, también ha sido estudiada, Reece (1988) propuso un proceso a escala laboratorio, el cual puede ser adaptado a gran escala para extraer enzimas proteolíticas del ensilaje de víscera de pescado, este proceso contempla tanto la extracción de proteasas alcalinas de salmón así como proteasas ácidas de bacalao y macarela. Las proteasas ácidas presentaron pH óptimo a 2.6 y fueron inactivadas a pH 6, la proteasa alcalina del salmón mostró su actividad óptima a pH de 8.5. Este tipo de enzimas poseen características que las hacen adecuadas para remover el desperdicio de músculo de pescado de la maquinaria utilizada en molienda de pescado, preparación de hidrolizados y la separación de aceite de tejidos grasos tales como el aceite de hígado de bacalao.

Raghunth y McCurd (1991) estudiaron la posibilidad de sintetizar plasteínas del ensilaje de víscera de pescado a pH 2.5, encontrando resultados óptimos para dicha síntesis cuando el grado de hidrólisis era del 65-70 %, lo cual se obtiene fácilmente en la hidrólisis causada durante el ensilaje.

Las variaciones genéticas entre especies, aunado a la adaptación a diferentes condiciones ambientales ha resultado en la propiedad distintiva de las proteasas de pescado tales como, la alta eficiencia catalítica a bajas temperaturas, baja estabilidad térmica y una sustancial actividad/estabilidad a pH neutros y alcalinos (Haard y Simpson, 1994).

La pepsina de pescado se ha considerado en general como resistente a la autólisis, la temperatura de desnaturalización térmica es a 20°C abajo de la de los mamíferos, esta característica las hace fácil de inactivar por un tratamiento térmico suave, una ventaja que puede ser utilizada en la manufactura de queso después de la reacción de coagulación de la leche (Haard y Simpson, 1994).

3- OBJETIVOS

Objetivo Global:

Desarrollar un ensilaje ácido a partir de los desperdicios de la industria del atún y evaluar su calidad nutricia por métodos químicos y biológicos.

Objetivos particulares:

1. Caracterizar los desperdicios que se generan en la industria del enlatado de atún.
2. Conocer los cambios que se presentan durante el proceso de ensilaje de estos subproductos.
3. Evaluar por métodos químicos la calidad nutricia del producto.
4. Evaluar por métodos biológicos la calidad nutricia del producto, utilizando pollos de engorda.

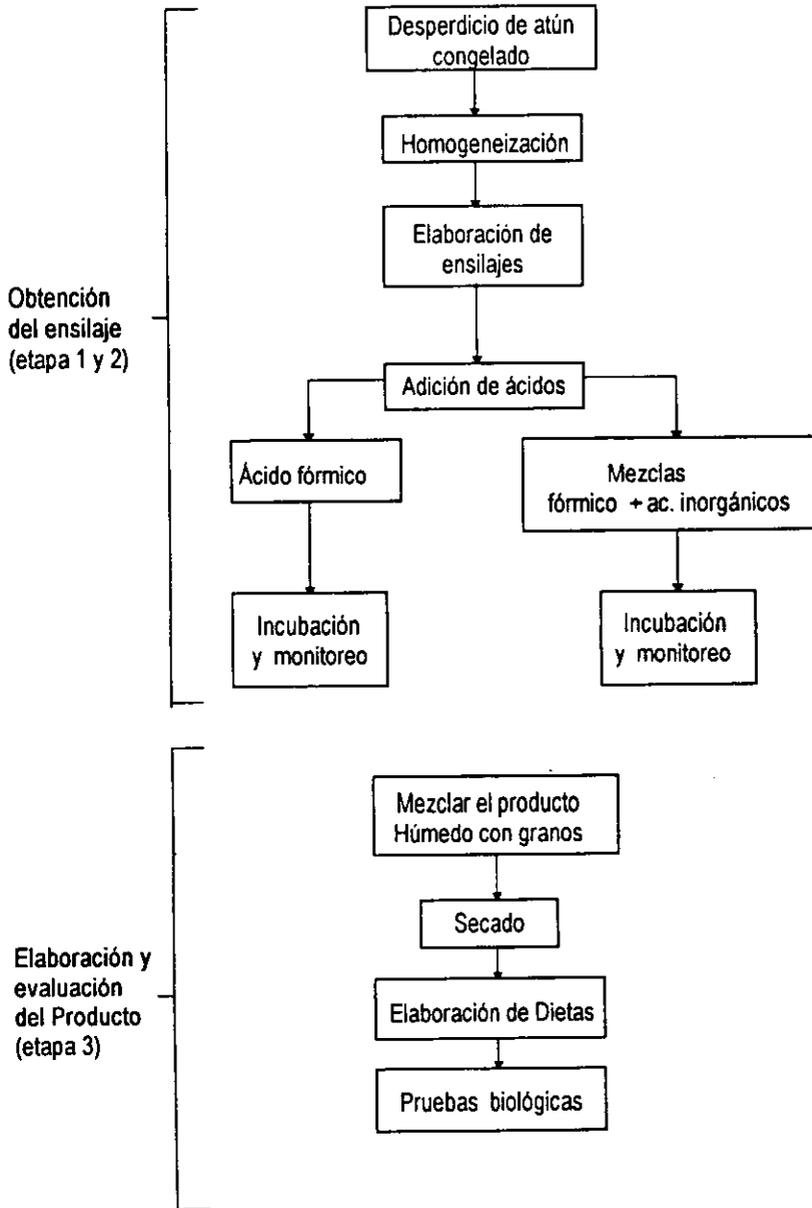
4- PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo se dividió en tres etapas, en vista de que se consideró de utilidad conocer previamente la efectividad de distintos ácidos y mezclas de los mismos para conservar el producto, lo cual se realizó durante la primera etapa.

Durante la segunda etapa, el trabajo se enfocó mas que nada a conocer los cambios químicos que se presentaban durante el proceso del ensilaje de estos subproductos, para lo cual se seleccionó un solo tratamiento de los empleados en la etapa 1.

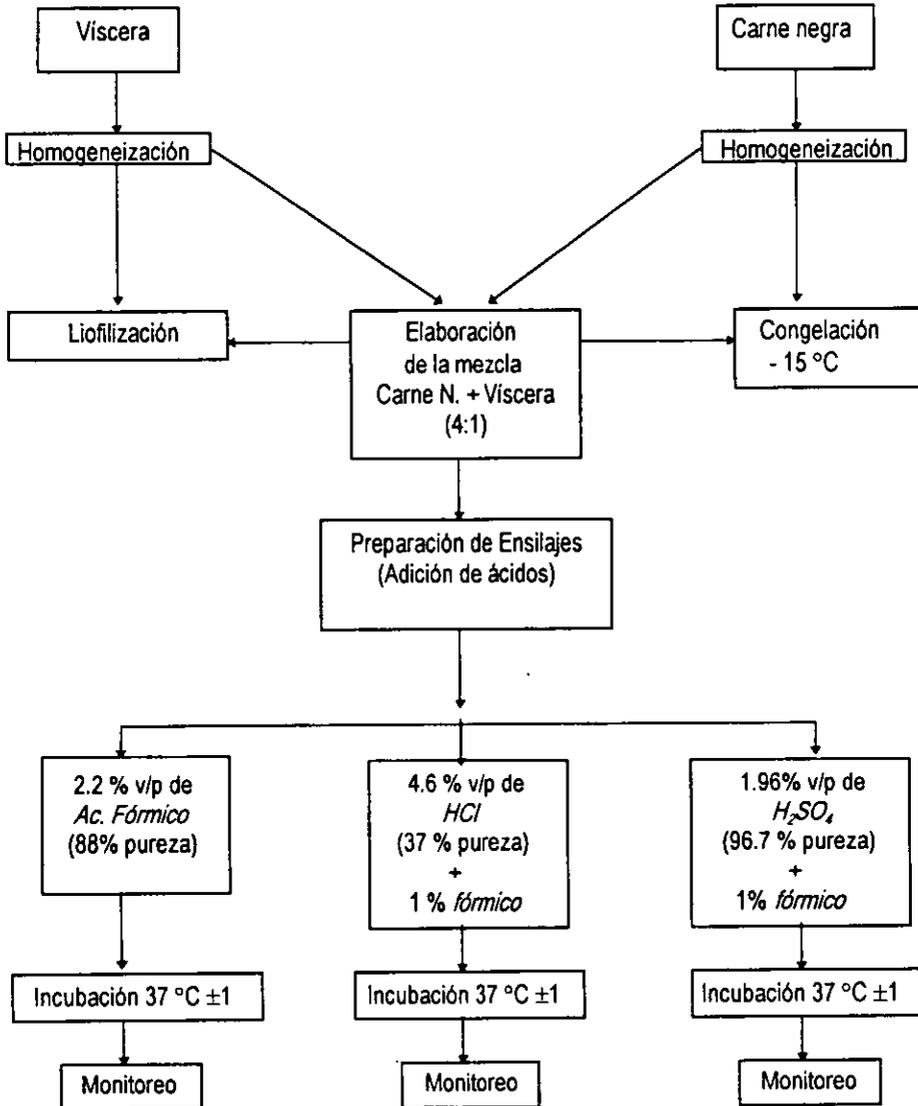
Finalmente en la tercera etapa, las condiciones para elaborar el ensilaje ya habían sido seleccionadas, por lo que el producto líquido obtenido se secó, mezclándolo con granos de sorgo, y por último se realizó la evaluación biológica del producto en los pollos de engorda. Estas etapas se encuentran mas detalladas en las siguientes páginas.

Figura 1:
Plan general de trabajo



4.1 ETAPA 1: Primer ensayo para obtener el ensilaje a nivel laboratorio

Figura 2:
Diagrama de actividades de la primera etapa



4.1.1 Materias primas

Se trabajó con el subproducto del proceso del enlatado del atún, el cual se compone de vísceras y carne negra, dichos materiales fueron proporcionados por la empresa enlatadora *ATUNES Y DERIVADOS S.A de C.V.* de Mazatlán, Sinaloa.

La víscera de atún fue obtenida de pescados inmediatamente descongelados que se encontraban a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, vísceras y agallas fueron extraídas. La carne negra se compone de la carne oscura no enlatable así como de colas, espinas y piel, todo este conjunto es un material cocido a vapor durante su procesamiento en la planta, la temperatura de cocimiento es aproximadamente de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para tratar que la materia prima fuera lo mas representativa posible se consideró que el material cocido que se obtenía de un solo pescado era similar al de los demás en cuanto a la proporción de sus componentes, por lo que se tomaba muestras de pescados cocidos enteros.

Los materiales fueron mantenidas en refrigeración dentro de hieleras y transportadas por avión, al cabo de 5 horas de haber sido muestreadas fueron congeladas a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ en la ciudad de México. Este procedimiento para obtener y manejar la materia prima fue similar en la primera y segunda etapa del trabajo. Para la tercera etapa todo el proceso se llevó acabo en el puerto de Mazatlán.

Para la carne negra, la homogeneización se llevó a cabo en un molino de carne, marca Hobart, modelo 84145. El material se sometió a dos sistemas de

molienda, el primero consistió en un picado utilizando navajas y el segundo fue una trituración, el material molido fue pasado a través de una placa de orificios de 4 mm de diámetro del mismo equipo. Las vísceras fueron homogeneizadas en licuadora. Una vez que las materias se encontraban homogeneizadas se elaboró una mezcla de carne negra+víscera en proporción de 4:1 respectivamente, a partir de esta mezcla se elaboraron los ensilajes ya que es en esta proporción en la que normalmente se generan estos desperdicios a nivel de planta.

De los tres materiales (carne negra, víscera y mezcla 4:1) se conservaron muestras tanto congeladas como liofilizadas para su caracterización.

4.1.2 Preparación de los ensilajes

Se elaboraron ensilajes de 250 g y se colocaron en frascos de vidrio ámbar de 500 ml. La mezcla se preparó para cada frasco. Se elaboraron 3 tipos de ensilajes ácidos y cada uno de ellos se hizo por triplicado. Una vez elaborados se incubaron a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Los 3 tipos de ensilajes fueron los siguientes:

1. Ensilaje utilizando ácido fórmico solo. El ácido tenía una pureza del 88 %, se ajustó hasta alcanzar un pH de 4.0. El ácido se añadió hasta que el pH se mantuvo constante lo cual ocurrió hasta las 24 horas. A las 31 horas se decidió disminuir el pH hasta 3.7 ya que en trabajos previos se ha informado que el pH tiende a aumentar lo cual podría haber causado contaminación de hongos (Strasidine y cols. 1980, Lo y cols. 1993, Aranson 1994). La concentración total final de ácido añadido fue de 2.2 % v/p.

2. Ensilaje utilizando ácido clorhídrico + ácido fórmico. Se añadió ac. clorhídrico (37 % de pureza) hasta ajustar el material a pH 2 (Uvalle, 1983; Aranson, 1994; Pérez, 1995), luego de añadió ácido fórmico a las 5 horas y a las 31 horas. La concentración final de clorhídrico y de fórmico fue de 4.6 y 1 % v/p respectivamente.
3. Ensilaje utilizando ácido sulfúrico (96.7 % de pureza) + ac. fórmico. Se siguió el procedimiento anterior y las concentraciones finales fueron 1.26 y 1 % v/p respectivamente. La pureza del ácido sulfúrico fué de 96.7 %.

4.1.3 Caracterización de la materia prima

1. A las 3 materias primas liofilizadas se les realizó análisis proximal según los métodos del AOAC (1990).
2. A las 3 materias primas congeladas se les realizó análisis de proteína por el método de micro- Kjeldahl (AOAC, 1990).
3. A la mezcla 4:1 congelada se le realizaron los siguientes análisis como parte de su monitoreo a tiempo cero:
 - *Nitrógeno no proteínico (NNP)*, el método consistió en preparar una solución de la muestra aproximadamente al 4 % p/v en ácido tricloroacético al 20 % v/p. Se dejó precipitar la proteína por espacio de tres horas. luego se filtró usando papel Whatman # 541 y al filtrado se le determinó por duplicado el nitrógeno por micro- Kjeldahl (Lo y cols., 1993). Los resultados se expresan como % de NNP del NT .

- *Nitrógeno soluble en agua (NS)*, El método fue similar al anterior solo que la muestra se disolvió en una solución de ácido acético aproximadamente 0.005 M, (Lees 1983). Los resultados se expresaron como % de NS del N total.
- *Análisis microbiológicos*. Se realizó recuento de mesófilos aerobios por el método de cuenta en agar placa estándar, coliformes totales por el método del número mas probable (NMP) usando caldo lauril sulfato triptosa, y también se realizó recuento de mohos y levaduras usando medio agar papa dextrosa (I.C.M.S.F., 1983).

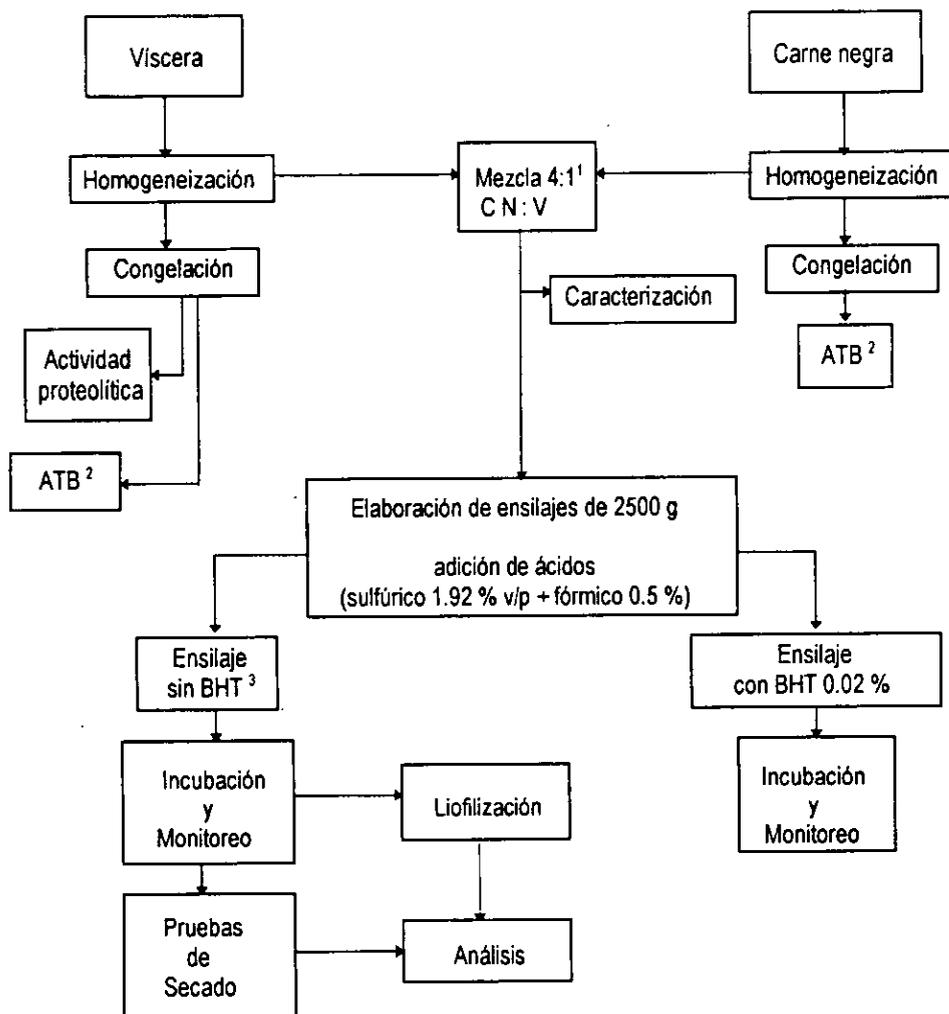
4.1.4 Monitoreo de parámetros durante el proceso del ensilaje

A los 3 ensilajes se les midió Nitrógeno no proteínico (NNP) y Nitrógeno soluble (NS) durante 35 días, el pH también se midió durante este periodo usando potenciómetro, y al final de este lapso se realizó el análisis microbiológico (mesófilos aerobios, coliformes totales, hongos y levaduras).

Los resultados de NNP producido en cada uno de los tres tratamientos a los 10, 20 y 35 días fueron analizados estadísticamente por análisis de varianza y se realizó la prueba de Duncan como prueba de rango múltiple para poder concluir cual era el tratamiento con mayor hidrólisis (Montgomery, 1991).

4.2 ETAPA 2: Segundo ensayo para obtener el ensilaje a nivel laboratorio.

Figura 3:
Diagrama de actividades de la segunda etapa



¹ Mezcla 4:1, mezcla de 4 partes de carne negra con una parte de viscera

² ATB: Análisis de la oxidación de la grasa por el método de ácido tiobarbitúrico

³ BHT: Antioxidante Butilhidroxitolueno.

4.2.1 Preparación de ensilajes:

Con base en los resultados del primer ensayo se seleccionó la mezcla sulfúrico + fórmico, considerando que desde el punto de vista microbiológico cualquiera de los tratamientos resultó adecuado, y por otro lado el ácido sulfúrico podría resultar más económico que los otros dos. En esta etapa se elaboraron ensilajes de 2500 g y se probó el efecto del butilhidroxitolueno (BHT) para controlar la oxidación de la grasa, se preparó un ensilaje con BHT y un control. Cada tratamiento se preparó por duplicado.

4.2.2 Análisis proximal, nitrógeno no proteínico y pH:

Estos parámetros aunque ya habían sido estudiados en la primera etapa, volvieron a ser medidos para verificar la reproducibilidad de los resultados entre ambos experimentos. El análisis proximal se realizó a la materia prima (mezcla 4:1), el NNP y el pH se le determinó a la materia prima y a los ensilajes.

4.2.3 Medición de actividad proteolítica

Se utilizó el método de Anson (1938), el cual se propone para medir la actividad proteolítica proveniente de la pepsina. Esta medición se le realizó solo a la viscera para caracterizar el estado inicial de la actividad enzimática proteolítica. se hicieron las modificaciones propuestas por Rick y Firtch (1974).

El fundamento de este método se basa en que los productos de hidrólisis por la acción de la pepsina sobre la hemoglobina, son solubles en ac. tricloroacético. La tirosina y el triptofano de estos productos pueden ser medidos por el método de Folín Ciocalteau (Rick y Firtch, 1974).

Se utilizó como sustrato una solución de hemoglobina bovina al 2 % (Sigma) en HCl 0.06 N. Se ha sugerido que con este sustrato (hemoglobina desnaturalizada) el pH óptimo de actividad varía de 3.1 a 4 de acuerdo a los autores antes mencionados y por otro lado en algunos trabajos (Norris y Mathies, 1954; Tangi y cols., 1988). Se demuestra que la actividad óptima de varios tipos de pepsina del atún se encuentra muy cercana a pH 3, y a una temperatura de 37 ° C por lo que estas condiciones se seleccionaron para la prueba. Las etapas del ensayo de actividad se describen en el anexo 1

4.2.3.1 Obtención del extracto enzimático:

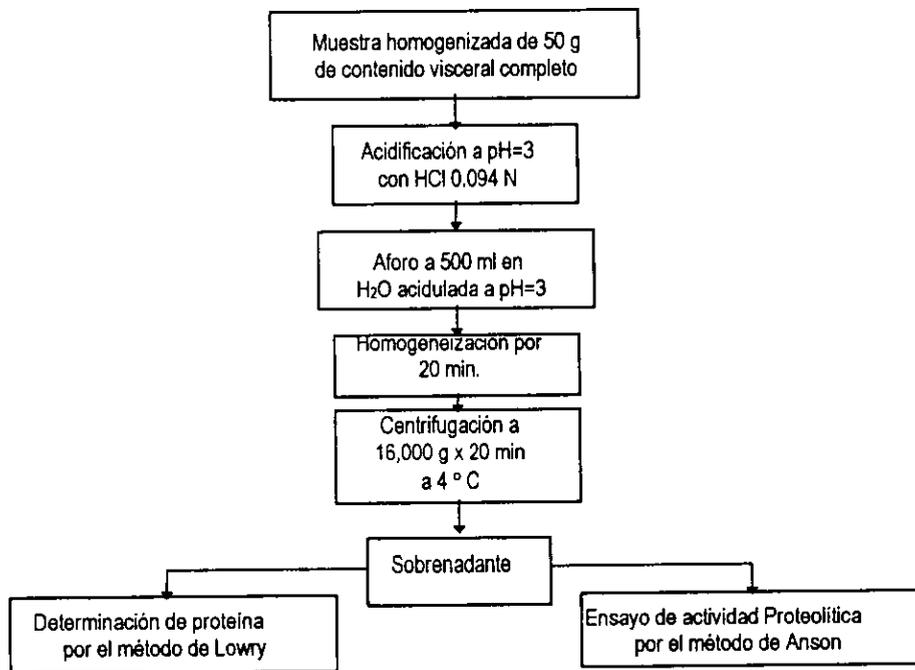
Se consideraron algunos trabajos previos (Norris y Mathies, 1954; Báez, 1980; Tangi y cols., 1988), en todas las etapas se mantuvo el material sobre hielo. El procedimiento que se realizó fue el siguiente y se ilustra en la figura 3:

1. De todo el contenido visceral que se homogeneizó durante 30 min. para la elaboración de los ensilajes, se tomó una muestra de 50 g y se congeló a -12 °C. para realizar la medición al día siguiente.
2. La muestra se descongeló y se llevó a pH 3 con HCl 0.094 N, con el fin de activar el pepsinógeno (Báez, 1980). Esta porción se llevó a un volumen de 500 ml en matraz aforado, con agua acidulada a pH 3.

3. El contenido del matraz se homogeneizó durante 20 min en licuadora, Inmediatamente después, se centrifugó a 16,000 g durante 20 min a 4 °C.
4. El sobrenadante se diluyó usando buffer fosfato-citrato a pH 3 (Gomori, 1970) para medir su actividad proteolítica y su contenido de proteína por el método de Lowry (Rick y Firtch, 1974).

Figura 4

Diagrama de obtención del extracto enzimático



4.2.3.2 Medición de proteína por el método de Lowry

El principio de este método consiste en dos fenómenos, por un lado la formación de un complejo colorido de cobre debido a la presencia de enlaces peptídicos y por otro lado la reducción del ácido fosfotúngstico- fosfomolibdico (Reactivo de Folin Ciocalteu) por los aminoácidos aromáticos (Rick y Firtch, 1974). La preparación de la muestra y la técnica para medir la cantidad de proteína, se describen en el anexo 2.

4.2.4 Determinación del grado de oxidación en la grasa de los ensilajes por el método el ácido tiobarbitúrico

Esta medición se le realizó a las materias primas, y a los ensilajes se les monitoreó durante 60 días.

Se utilizó el método propuesto por Vyncke (1970), este consiste en medir sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico las cuales se expresan como malonaldehído. En este método la determinación se realiza a un extracto de pescado, utilizando una solución de ácido tricloroacético al 7.5 % p/v en agua. El malonaldehído es el principal compuesto producido en la oxidación de lípidos el cual al reaccionar con el ácido tiobarbitúrico produce un pigmento rojo que se puede leer espectrofotométricamente a 538 nm. Las etapas del método se describen en el anexo 3.

Antes de emplear esta técnica, se le determinó el porcentaje de recuperación utilizando una muestra de los ensilajes elaborados en la primera etapa experimental, la cual se mezcló con solución de trabajo de tetraetoxipropano, esta prueba mostró un porcentaje de recuperación del 92 % (ver anexo 4).

4.2.5 Medición de trimetilamina

Este parámetro se le midió a la mezcla 4:1 al inicio, y se le monitorearon los cambios durante 60 días en el ensilaje. Se utilizó el método de Dyer (1959) descrito en la AOAC (1990). Este método se basa en una determinación colorimétrica haciendo reaccionar a la trimetilamina con ácido pícrico, formando un compuesto colorido que absorbe a 410 nm (Boland y Paige, 1971). La descripción del método se hace en el anexo 5.

4.2.6 Pruebas de secado y análisis realizados al producto final del ensilaje

Después de mantenerse en almacenamiento durante 20 días a 37°C, una parte del ensilaje se liofilizó, tanto a este liofilizado como a la materia prima liofilizada previamente al inicio del experimento se le realizaron determinaciones de triptofano (Akeson y Stalerman, 1964; Rama Dao y cols., 1974) y lisina disponible (Carpenter y cols., 1957). Además, de otra porción de este mismo ensilaje se realizaron algunas pruebas de secado para seleccionar las

proporciones de ensilaje y sorgo adecuadas en cuanto a consistencia, la cual se evaluó de manera visual, las proporciones empleadas de ensilaje:sorgo fueron 85:15, 70:30 y 60:40. El objetivo de esta prueba fue únicamente observar la consistencia de la proporción y el tiempo aproximado de secado, puesto que para la etapa final de este trabajo (etapa # 3) se planteó secar un ensilaje obtenido a nivel de planta piloto en el puerto de Mazatlán, para transportarlo ya seco a la ciudad de México y realizar la prueba biológica con pollos de engorda. Se utilizaron temperaturas de 80°C y 40°C, y se empleó estufa. Al producto seco de la proporción 85:15 se le determinó lisina disponible por el método de Carpenter, además tanto a la materia prima como al producto secado en la proporción 85:15 se les determinó las concentraciones de sodio, potasio, fierro, zinc y calcio por espectrometría de absorción atómica (AOAC, 1990) y fósforo por método colorimétrico (AOAC, 1990).

4.3 ETAPA 3: Obtención del ensilaje a nivel de planta piloto y su evaluación **nutricia en pollos de engorda**

Esta etapa se realizó en el puerto de Mazatlán y las materias primas fueron colectadas el mismo día en que fueron procesadas. La homogeneización y la acidificación fueron realizadas en las instalaciones del *Instituto Tecnológico del Mar de Mazatlán* (ITMAR), la cercanía de este centro con respecto a la planta fue ideal para el rápido procesamiento de las muestras, además de que posee en su taller de alimentos un equipo de molienda cuya capacidad se adecuó perfectamente a las características del experimento. Las materias primas fueron molidas en un equipo Cutter de acero inoxidable marca Mapisa modelo PICTC-3 de 3 cuchillas.

4.3.1 Preparación del ensilaje

Los materiales ya molidos y homogeneizados se colocaron en cubetas de 20 litros. En cada una se le colocaron 10 kg de la mezcla 4:1, e inmediatamente fueron acidificados primero con el ácido sulfúrico y luego con el fórmico, la acidificación se realizó lentamente y con agitación constante para tratar de que la distribución del ácido fuera lo mas homogénea posible, la agitación se realizó con un trozo de madera perfectamente limpio. Se prepararon 3 de estos silos haciendo en total 30 kg. de ensilaje húmedo.

La incubación se realizó a temperatura ambiente, los tres silos fueron colocados bajo techo para evitar que el sol les tocara directamente, la temperatura en esa zona donde los silos fueron almacenados se registró diariamente, siendo de 34 ± 2 °C durante el experimento.

4.3.2 Secado del ensilaje

La hidrólisis se detuvo a los 8 días de incubación ya que en este punto se realizó el secado. Los silos fueron trasladados a las instalaciones del *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo* Unidad Mazatlán (CIAD), allí se realizó el secado del ensilaje.

El ensilaje húmedo se mezcló con sorgo que había sido previamente molido en un equipo marca Micron 1LA2182yk30. La mezcla empleada de ensilaje húmedo+sorgo fue 70:30 respectivamente, esto fue elegido en porque ya se había demostrado en el laboratorio que esta mezcla adquiriría una consistencia que facilitaba el secado sin disminuir demasiado la concentración final de proteína en el producto seco.

La mezcla se homogeneizó durante 20 min a la velocidad No. 1 en una mezcladora de marca Hobart, modelo A-200T. Ya homogeneizada se extendió en capas de aprox. 3 mm de espesor en charolas previamente forradas con papel aluminio, el secado se realizó en un deshidratador de corrientes de aire. El aire se calentaba al pasar a través de una resistencia colocada en la parte inferior, ya caliente, era expulsado por la parte superior mediante un extractor de aspas, lo

cual hacía circular al aire caliente por todas las charolas. La temperatura se mantuvo a $39\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ y el tiempo necesario para secar el material fue de 10 horas aproximadamente.

El producto ya seco (mezcla ensilaje+sorgo), se transportó a la ciudad de México por autobús, se le realizó análisis proximal y aminoácidos por cromatografía de intercambio iónico. Con este producto se realizó una prueba de alimentación con pollos de engorda.

4.3.3 Prueba de alimentación con pollos de engorda

Esta prueba se realizó en el *Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA)* de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El experimento, se realizó en la segunda quincena del mes de Septiembre de 1997, se trabajó con 120 pollos de engorda de la estirpe **Arbor Acres**, de nueve días de edad, los cuales se distribuyeron con base en un diseño experimental completamente al azar en cuatro tratamientos, cada uno con tres réplicas de 10 pollos cada una.

4.3.3.1 Manejo de las aves

El experimento se llevó a cabo en una criadora eléctrica en batería de la marca *Petersime modelo 2 SD 12 serie 3483*, la cual constaba de 12 secciones, cada una se utilizó para cada réplica. Las secciones estaban equipadas de 2

comederos y 1 bebedero, la temperatura de cada jaula estaba controlada de manera automática por un termostato, durante los primeros 11 días del experimento se mantuvieron en 90° F (32.2° C) y luego se redujeron a 86° F (30°C) hasta terminar el experimento (últimos 3 días).

Los pollos antes de iniciar el experimento habían sido mantenidos con una dieta sorgo-soya para iniciación. A partir de los 9 días de edad de las aves, se inició el experimento y se probaron cuatro niveles de inclusión del producto seco ensilaje+sorgo que fueron de 0, 5, 10 y 15 % en dietas sorgo-soya para pollos en iniciación.

Los niveles seleccionados del producto ensilaje+sorgo fueron elegidos con base en que un nivel superior al 15 % ocasionaría exceso en la cantidad de sodio, por otro lado los niveles del 5 y 10 % caen dentro del rango usado para harinas de pescado por la industria avícola. En las tablas 2 y 3 se muestran las dietas formuladas con el paquete nutricional *Nutrion III*; así como, el análisis calculado de las mismas, cubriendo las necesidades de nutrientes para el pollo en la etapa de iniciación

Los pollos fueron pesados al inicio del experimento en grupos de 10 animales, luego se les dió alimento suficiente, el cual se volvía a añadir a los comederos antes de que este se terminara, el agua que se les dió estuvo medicada durante los primeros 5 días de experimento, ésta contenía 0.5 g de Acuayodol por litro (expectorante de la marca Bayer) y 2 g de Strepen Vitaminado por litro (antibiótico y vitaminas solubles de la marca Intervet). el agua se cambiaba y los bebederos se lavaban diariamente. A los pollos se les midió el

consumo de alimento y su ganancia en peso y se calculó la conversión alimenticia.

Los animales fueron vacunados al décimo día del experimento (18 días de edad), con la vacuna contra la enfermedad de Newcastle Lasota (marca Intervet), y la vacuna contra la enfermedad de Gumbord (marca Avimex), ambas por vía ocular, además se les aplicó una vacuna emulsionada contra la enfermedad de Newcastle por vía intramuscular en el cuello para reforzar la respuesta inmunológica de la primera.

Tabla 2:

Composición de las dietas experimentales

Ingrediente kg./ton.	Testigo	5 %	10%	15 %
Sorgo	541.300	535.246	528.976	519.715
Pasta de soya (46 % de PC)	373.640	344.090	314.574	285.636
Ensilaje+sorgo (70:30)	---	50.000	100.000	150.000
Aceite vegetal	39.587	29.970	20.420	13.497
Ortofosfato de calcio	19.990	17.821	15.650	12.393
Carbonato de calcio	12.750	12.633	12.516	11.830
Sal (NaCl)	4.740	2.678	0.615	---
Vitaminas^a	2.500	2.500	2.500	2.500
DL-Metionina	2.320	1.911	1.595	1.280
Mezcla de minerales^b	1.000	1.000	1.000	1.000
Cloruro de colina al 60 %	1.000	1.000	1.000	1.000
Bacitracina	0.500	0.500	0.500	0.500
Antioxidante^c	0.400	0.400	0.400	0.400
Mold-X^d	0.250	0.250	0.250	0.250

^a Premezcla vitamínica, aporta por kg. de dieta: Vitamina A 12000 UI, Vitamina D3 2500 UIP, Vitamina E 30 UI, Vitamina K3 2 mg, Riboflavina 7.5 mg, Vitamina B6 3.5 mg, Vitamina B12 0.020 mg, Niacina 45 mg, ácido Pantoténico 12.5 mg, Biotina 0.125 mg, ácido Fólico 1.5 mg.

^b Premezcla de minerales aporta por kg. de dieta: Zinc 50 mg, Cobre 12 mg, Iodo 0.3 mg, Cobalto 0.2 mg, Hierro 110 mg, Selenio 0.1 mg y Manganeso 110 mg.

^c Antioxidante: BHT

^d Fungicida: Propionato

Tabla 3:

Composición calculada de las dietas para la prueba biológica con pollos de engorda

Ingrediente	Testigo	5 %	10 %	15 %
Proteína cruda %	22.00	22.00	22.00	22.00
Metionina %	0.56	0.55	0.55	0.55
Metionina+Cisteína %	0.90	0.90	0.91	0.92
Lisina %	1.20	1.23	1.26	1.29
Calcio total %	1.00	1.00	1.00	1.00
Fósforo disponible %	0.50	0.50	0.50	0.50
Sodio %	0.21	0.21	0.21	0.27

5- RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 Resultados y discusión de la etapa 1

(Primer ensayo a nivel laboratorio)

5.1.1 Análisis proximal de las materias primas

La determinación de la humedad gruesa realizada mediante la liofilización mostró que la carne negra (material cocido) presentaba una cantidad de agua del 61 %, lo cual fue inferior comparado con la víscera (material fresco) que presentó un 75.79 % esto resulta fácil de entender pues el primer material había sido cocido en la planta y había perdido agua, sin embargo es posible que la cantidad de humedad en el músculo fresco también sea menor a la de la víscera; según se informa la humedad en el atún aleta azul (*Thunnus thynnus*) es del 62 % (Belitz, 1988).

Después de la liofilización, la humedad retenida en la harina de la carne negra fue mayor que en la víscera liofilizada, es posible que la facilidad de la víscera de ser homogeneizada fue un factor que ayudó la liberación del agua en la liofilización. Respecto a la proteína de la harina de víscera esta fue de 69.28 %, es decir casi un 18 % más que la carne negra (51.34 %), esto se explica por el hecho de que la carne negra está compuesta en buena parte de espinas lo cual se refleja en sus cenizas (21.56 %). Además el contenido de grasa resultó mayor en la carne negra, aunque se considera que el contenido visceral de los peces es rico en lípidos, en el caso de los peces migratorios como lo es el atún, estos contienen una buena porción de músculo oscuro (carne negra) el cual se

caracteriza por su elevado contenido de lípidos (Fennema, 1993; Macrae y cols., 1993). Los resultados de la mezcla 4:1 se comportaron de acuerdo a la proporción. Los resultados del análisis proximal se muestran en la tabla 4.

Tabla 4
Análisis proximal de las materias primas

Muestra	Humedad gruesa	Humedad en harina	Proteína de la Harina	Extr. etéreo en la harina	Cenizas en la harina
Carne					
Negra	61.79 ± 1.17	4.11 ± 0.03	51.34 ± 1.5	22.24 ± 0.87	21.56 ± 0.59
Viscera					
	75.79 ± 0.27	2.73 ± 0.09	69.28 ± 1.56	14.84 ± 0.17	12.68 ± 0.14
Mezcla:					
CN:V	63.97 ± 2.77	4.08 ± 0.03	55.75 ± 1.72	18.64 ± 0.43	19.93 ± 0.46

CN:V= Carne negra+Viscera en proporción 4 a 1 respectivamente.

Todos son triplicados

5.1.2 pH

Se encontró que la materia prima antes de ensilar (mezcla 4:1) poseía un pH de 6; se ha informado que uno de los indicadores de la calidad del pescado es el pH, el cual debe estar entre 6 y 6.5, cuando el pH llega a 7 se considera descompuesto (Belitz, 1988).

En la tabla 5 se observa que el pH alcanzado a las 24 hrs. en el ensilaje de ácido fórmico no tuvo cambio notable durante las siguientes 7 horas (31 hrs. a

partir del inicio), sin embargo se decidió disminuir el pH hasta 3.7 en este punto, para dar margen a un aumento, pero se mantuvo constante, esto sugiere que el pH alcanzado a las 24 horas ya se comporta de manera constante. Lo mismo ocurrió en el caso de los otros dos ensilajes donde el pH tuvo muy ligeras variaciones a partir de las 24 hrs., desde pH 3 hasta pH 2.68 para el ensilaje con ácido clorhídrico y de pH 3.2 a pH 2.98 para el ensilaje con ac. sulfúrico lo cual sugiere que la cantidad de ácido fórmico requerido podría ser de 0.5 % v/p, esto se consideró en los experimentos de las próximas etapas. Estos resultados se ilustran también en la gráfica 5.

Tabla 5

Comportamiento del pH durante 35 días

Tiempo (horas)	pH del ensilaje Fórmico solo	pH del ensilaje HCl + Fórmico	pH del Ensilaje H ₂ SO ₄ + Fórmico
0	6	6	6
	3.96 ¹	2 ⁵	2 ⁸
5	4.26	2.9	2.9
	3.93 ²	2.7 ⁸	2.7 ⁹
24	4.43	3.2	3.3
	3.91 ³	3.2	3.3
31	3.85	3.2	3.4
	3.7 ⁴	3.0 ⁷	3.2 ¹⁰
48	3.76	2.96	3.03
72	3.8	2.86	3.03
96	3.68	2.85	3.01
120	3.71	2.83	3.08
144	3.71	2.83	2.9
165	3.56	2.68	2.93
192	3.7	2.7	2.96
216	3.53	2.73	3
240	3.61	2.78	3.03
264	3.63	2.78	3.01
288	3.61	2.73	3.03
312	3.60	2.63	3.03
360	3.6	2.66	3.05
408	3.63	2.7	3
456	3.63	2.7	2.98
852	3.63	2.68	2.98

Ensilaje con ácido fórmico

- ¹ Adición de 2 ml de ac. Fórmico
- ² Adición de 1 ml de ac. Fórmico
- ³ Adición de 2 ml de ac. Fórmico
- ⁴ Adición de 0.5 ml de ac. Fórmico

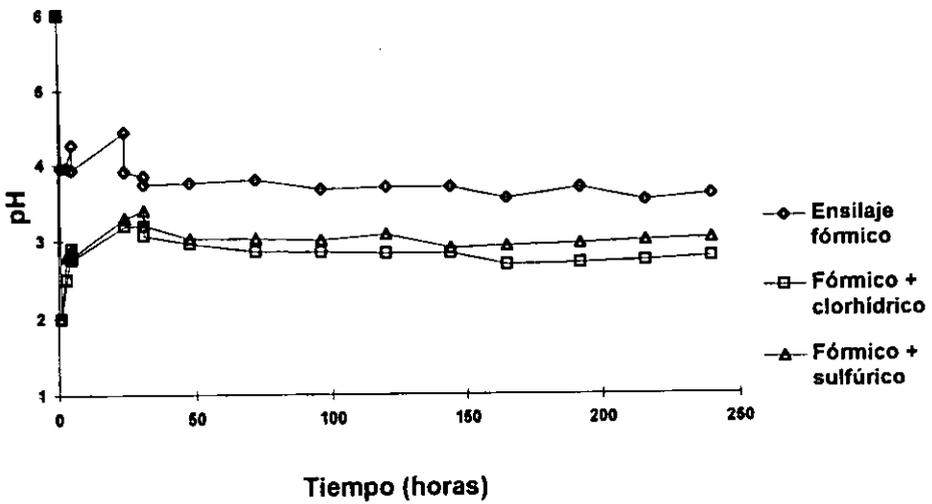
Ensilaje con ácido fórmico y clorhídrico

- ⁵ Adición de 11.5 ml de ac. Clorhídrico
- ⁶ Adición de 1.25 ml de ac. Fórmico
- ⁷ Adición de 1.25 ml de ac. Fórmico

Ensilaje con ácido fórmico y sulfúrico

- ⁸ Adición de 4.9 ml de ac. Sulfúrico
- ⁹ Adición de 1.25 ml de ac. Fórmico
- ¹⁰ Adición de 1.25 ml de ac. Fórmico

Figura 5
Comportamiento del pH en
ensilajes



5.1.3 Nitrógeno total, nitrógeno no proteínico y nitrógeno soluble.

En las materias primas la mayor cantidad de nitrógeno lo presentó la carne negra (tabla 6).

Tabla 6

Nitrógeno total, soluble y no proteínico en las materias primas

expresados como porcentaje de la muestra

Muestra	N. total	N. Soluble	N. No Proteinico
Carne Negra	3.001±0.13		
Viscera	2.65±0.02		
Mezcla 4:1	2.9±0.08	1.031±0.053	0.65±0.01

Todas las mediciones fueron hechas por triplicado, excepto . N. total de la carne negra y de la mezcla 4:1 que fueron duplicados.

En el caso de los resultados de NNP y NS, la medición a la materia prima (mezcla 4:1) se realizó a la 24 hrs. de homogeneizada la muestra, ya que se analizó junto con los ensilajes (determinación del día 1). El tiempo desde su homogeneización hasta su análisis se mantuvo congelada (-15 °C). Es de suponerse que la baja temperatura y el pH alto de la muestra inicial impidieron que durante ese tiempo avanzara la hidrólisis de la proteína. Los valores de NNP y NS únicamente se les determinó a la mezcla 4:1 ya que lo que se buscaba era

conocer estos parámetros antes de iniciar la hidrólisis en los ensilajes y se le consideró la determinación a tiempo cero para la elaboración de las gráficas.

En los ensilajes los cálculos de NNP y NS se realizaron con base en los valores de nitrógeno total, por lo cual esta determinación se realizaba en cada día de monitoreo para evitar algún error en los cálculos por la posible evaporación de humedad que pudiera ocurrir a 37°C, lo cual podría hacer variar su concentración relativa y afectar los cálculos de NNP y NS, sin embargo se observó que el porcentaje de N total no tuvo variaciones significativas a lo largo del monitoreo, los resultados de NT se muestran en el anexo 6, además los valores de nitrógeno soluble durante el monitoreo también fueron expresados en forma de proteína solubilizada y se muestran en el anexo 7. En el caso del ensilaje con ac. sulfúrico + fórmico, el frasco número 1 se quebró al inicio del monitoreo, motivo por el cual este tratamiento se quedó solo como duplicado.

Los resultados de formación de NNP y NS en los ensilajes se muestran en las tablas de la 7 a la 12, tanto expresados como porcentaje de la muestra, como en porcentaje en relación al nitrógeno total. En las figuras 6 y 7 se encuentran graficados los resultados de dichas tablas.

Tabla 7

**Evolución del nitrógeno no proteínico (NNP) del ensilaje
elaborado con ácido fórmico solo**

	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 10</i>	<i>Día 20</i>	<i>Día 35</i>
% de NNP de muestra total	1.399 ± 0.026	1.68 ± 0.027	1.789 ± 0.043	1.937 ± 0.04	2.02 ± 0.07	2.22 ± 0.07
% de NNP de N. total	49.78 ± 1.98	60.43 ± 1.169	64.78 ± 0.79	66.74 ± 0.54	70.46 ± 2.64	70.46 ± 2.64

Las determinaciones fueron hechas por triplicado

Tabla 8

**Evolución del nitrógeno soluble (NS) del ensilaje
elaborado con ácido fórmico solo**

	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 10</i>	<i>Día 20</i>	<i>Día 35</i>
% de NS de muestra	1.79 ± 0.04	1.807 ±0.05	1.967 ± 0.05	2.06 ± 0.06	2.18 ± 0.09
% de NS de N total	64.25 ± 2.62	65.45 ± 2.17	67.73 ± 1.45	71.86 ± 0.47	74.32 ± 1.68

Las mediciones fueron hechas por triplicado

Tabla 9

Evolución del nitrógeno no proteínico (NNP) del ensilaje

elaborado con ácido fórmico + clorhídrico

	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 10</i>	<i>Día 20</i>	<i>Día 35</i>
% de NNP de la muestra	1.10 ± 0.022	1.39 ± 0.023	1.499 ± 0.006	1.67 ± 0.034	1.933 ± 0.079	2.01 ± 0.053
% de NNP de N. total	40.87 ± 1.32	51.37 ± 0.36	54.05 ± 0.39	57.89 ± 0.72	68.31 ± 2.86	70.14 ± 2.13

Las mediciones fueron hechas por triplicado

Tabla 10

Evolución del nitrógeno soluble (NS) del ensilaje

elaborado con ácido fórmico + clorhídrico

	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 10</i>	<i>Día 20</i>	<i>Día 35</i>
% de NS de muestra	1.47 ± 0.04	1.53 ± 0.01	1.88 ± 0.06	1.94 ± 0.07	2.0980 ± 0.043
% de NS de N total	54.52 ± 1.38	55.30 ± 0.78	65.23 ± 2.19	68.94 ± 1.98	73.16 ± 2.42

Las mediciones fueron hechas por triplicado

Tabla 11

**Evolución del nitrógeno no proteínico (NNP) del ensilaje
elaborado con ácido fórmico + sulfúrico**

	<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 10</i>	<i>Día 20</i>	<i>Día 35</i>
% de NNP de la muestra	1.13 ± 0.003	1.44 ±0.07	1.485 ±0.02	1.64 ±0.087	1.94 ±0.05	2.02 ± 0.008
% de NNP de N. total	39.78 ± 1.01	52.93± 1.86	54.34± 0.29	57.64 ± 0.84	69.39 ± 1.95	70.58 ± 0.19

Las mediciones fueron hechas por duplicado de las muestras 2 y 3

Tabla 12

**Evolución del nitrógeno soluble (NS) del ensilaje
elaborado con ácido fórmico + sulfúrico**

	<i>Día 2</i>	<i>Día 4</i>	<i>Día 10</i>	<i>Día 20</i>	<i>Día 35</i>
% de NS de muestra	1.58 ± 0.01	1.587 ± 0.007	1.88 ± 0.014	1.94 ± 0.05	2.05 ± 0.38
% de NS de N total	58.12 ±0.51	58.1 ± 0.7	65.94 ± 0.91	69.30 ± 1.95	72.47 ± 1.41

Las mediciones fueron hechas por duplicado de las muestras 2 y 3

Figura 6
Evolución del nitrógeno no proteínico

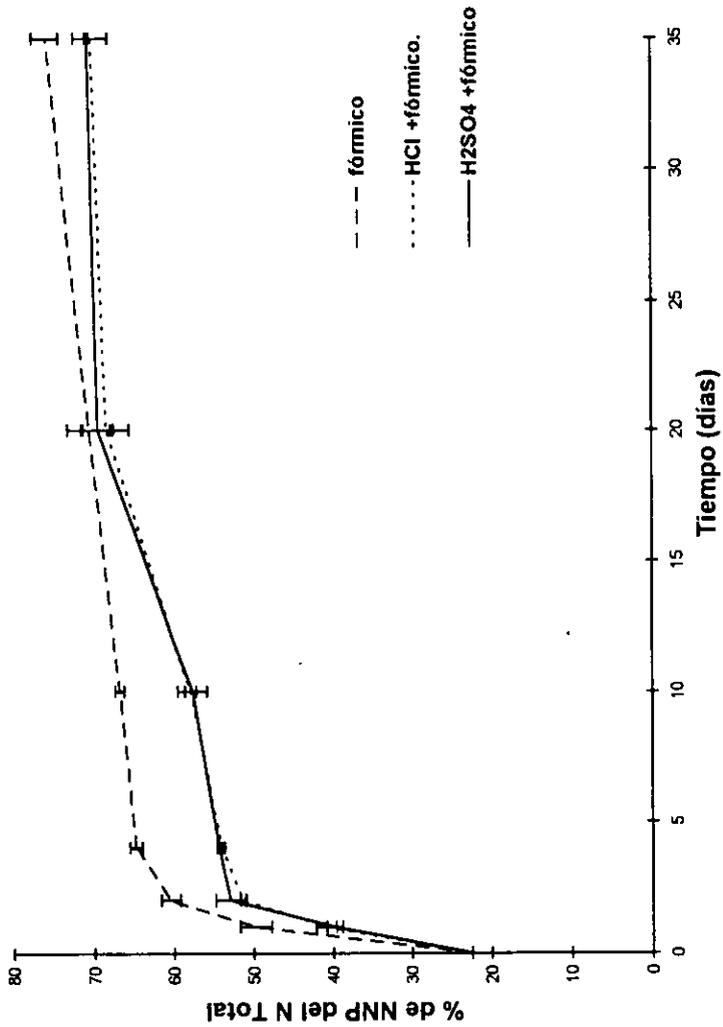
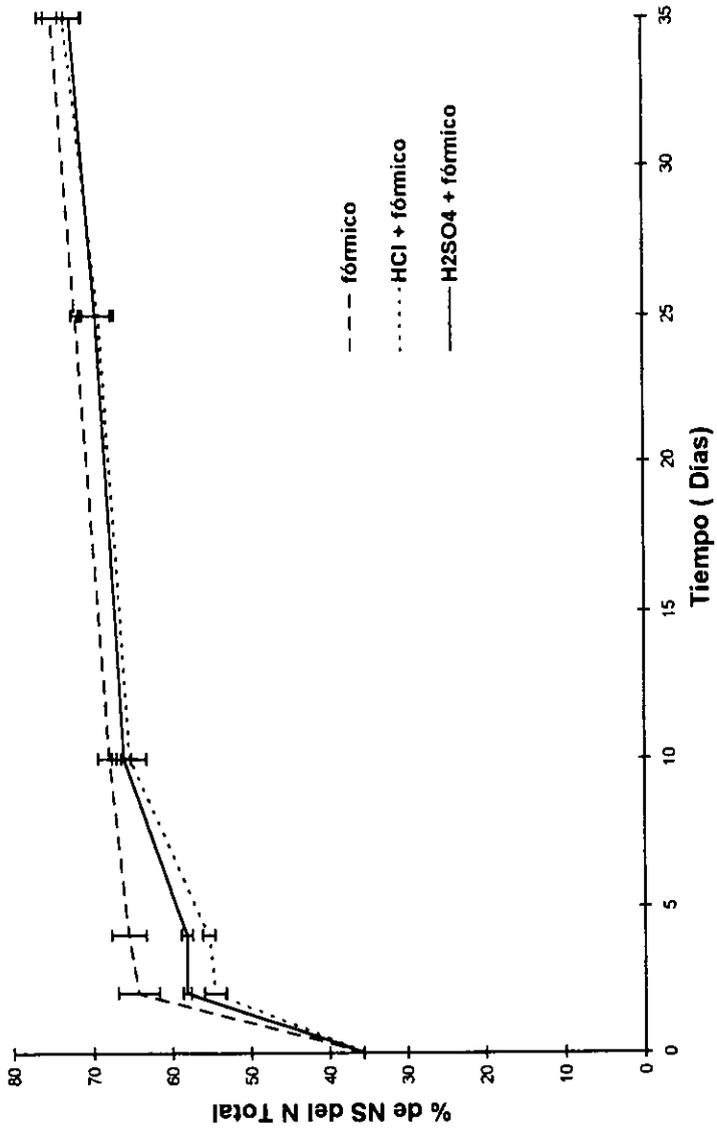


Figura 7
Evolución del nitrógeno soluble



En la figura 6 se observa que los cambios mas notables del nitrógeno no proteínico ocurren durante los primeros 4 días para el caso del ensilaje con ácido fórmico, mientras que para los otros dos presentaban cambios aún a los 20 días. Esta tendencia se ha observado también en otros trabajos (Gildberg y Raa, 1977), es posible que esto se deba a que el pH óptimo para la pepsina de atún se sitúa entre 3 y 4 (Norris y Mathies, 1953; Tangi y cols., 1988) lo cual coloca a las enzimas del ensilaje elaborado únicamente con ácido fórmico, en un rango de pH mas cercano al óptimo en comparación con el pH que se tenía en los ensilajes elaborados con mezclas de ácidos (ver tabla 5).

En el caso del N. soluble, se puede ver que los cambios mas notorios para el ensilaje elaborado con ácido fórmico ocurrieron en los primeros 4 días, mientras que en los otros dos ensilajes, ocurrieron en los primeros 10 días. Comparando el comportamiento de NNP y NS se puede observar una tendencia muy similar por lo que ambas metodologías se complementaron muy bien. Los valores mas elevados de NS comparado con los de NNP se deben a que la técnica de NS no utiliza precipitación lo cual hace que se incluya tanto la proteína solubilizada con capacidad de precipitarse, así como péptidos y aminoácidos.

En algunas publicaciones se ha informado que al cabo de una semana puede llegarse a obtener aproximadamente un 70 % de NNP (expresado en gramos de N total), pero esto es dependiente del tipo de material ensilado puesto que el contenido de enzima así como el estado de las mismas puede afectar la hidrólisis (Aranson, 1994). Es de suponerse que una buena parte de las enzimas del músculo (catepsinas) se encontraban inactivadas por el tratamiento térmico

recibido en la planta, y que por tanto eran las enzimas de la víscera (pepsina) las únicas activas, respecto a esto, Stone y Hardy (1986) informaron un menor grado de hidrólisis de la proteína cuando la única enzima que actúa es la pepsina comparado con ensilajes en donde participan también las catepsinas del músculo. El análisis estadístico se muestra en el anexo 8, y se puede observar que el tratamiento con ácido fórmico presentó valores significativamente mas altos que los otros 2 tratamientos, aunque esta diferencia no fué estadísticamente significativo a los 20 días ($p > 0.05$), en general los tres tratamientos presentaron adecuados valores de NNP.

5.1.4 Análisis microbiológicos

Estos análisis se realizaron a los ensilajes a los 30 días de elaborados. Se observa en la tabla 13 que a pesar de que la materia prima se encontraba muy contaminada, al cabo de un mes no hubo crecimiento microbiano en ninguno de los ensilajes. Por un lado el pH de los ensilajes es poco propicio para el desarrollo de microorganismos y por otro lado los iones hidrógeno no difunden a través de las membranas celulares a menos que se encuentren débilmente ionizados como ocurre con los ácidos débiles como el fórmico, el cual a un pH de 3.75 se encuentra al 50 % ionizado, esto ocasiona el descenso del pH interno y la muerte celular (Doores, 1993).

Tabla 13

Análisis microbiológico en ensilajes después de 30 días.

	Mesófilos Aerobios		Coliformes Totales		Hongos		Levaduras	
	UFC ¹ /g de muestra	NMP ² /g muestra	UFC ¹ /g muestra	NMP ² /g muestra	UFC ¹ /g de muestra	NMP ² /g de muestra	UFC ¹ /g de muestra	NMP ² /g de muestra
Materia prima	1.15 x 10 ⁶		1100		70		80	
Ensilaje con ac. fórmico	<10		<10		<10		<10	
Ensilaje con ac. fórmico y clorhídrico	<10		<10		<10		<10	
Ensilaje con ac. fórmico y sulfúrico	<10		<10		<10		<10	

¹UFC: Unidades formadoras de colonias.

²NMP: Número mas probable

5.1.5 Conclusiones de la primera etapa

Se elige el tratamiento fórmico + sulfúrico en proporciones 0.5 % v/p y 1.96 % v/p respectivamente para trabajar en las siguientes etapas.

El análisis estadístico muestra que sí hay diferencia altamente significativa en cuanto a la hidrólisis, pero los tres tratamientos presentaron rendimientos considerables, además en cuanto a costo, el ensilaje con ácido sulfúrico podría resultar mas económico que el elaborado con puro fórmico, y un poco mas económico que el elaborado con fórmico y clorhídrico, en cuanto a la calidad microbiológica, esta fue adecuada en los tres tratamientos. El análisis estadístico se muestra en el anexo 8.

5.2 Resultados y discusión de la etapa 2

(Segundo ensayo a nivel laboratorio)

5.2.1 Análisis proximal de la materia prima

En la tabla 14 se puede observar que el lote de materia prima utilizado en este segundo presentó una concentración mas alta en proteína y mas baja en cenizas que la muestra que se utilizó en el primer ensayo (tabla 4), esto puede ser atribuído muy posiblemente a que el pescado había sido capturado en épocas distintas. Se encontró además que el porcentaje de extracto etéreo obtenido resulta bajo, por lo cual la suma de los porcentos de todos los componentes únicamente es del 95 % , sin embargo la mayor cantidad de grasa extraída se obtuvo con éter etílico (11 %) ya que cuando se utilizó éter de petróleo el porcentaje de extracción solo llegaba al 5 %, lo que sugirió que se probara el éter etílico durante 10 horas, estos resultados son los que hacen suponer que el porcentaje restante es de grasa. La dificultad para extraer la grasa puede ser explicada por el grado de oxidación que presentaba la materia prima, de cualquier manera puede resultar interesante en posteriores estudios probar la técnica de Bligh y Dyer (1959)

Tabla 14

Análisis proximal de la materia prima

Muestra	Humedad gruesa	Humedad de la harina	Proteína de la harina	Ext. etéreo en harina	Cenizas en harina
Mezcla 4:1	68 ±1.38	4.03±0.095	72.22±1.11	11.24±0.11	7.71±0.21

Triplicados

5.2.2 pH

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

En la tabla 15 se muestra que la mezcla 4:1 presentó un pH de 6.1 confirmando de nuevo que el material no se encontraba descompuesto (Belitz 1988), sin embargo Bello y Brito (1994) consideran que ensilajes elaborados con materias primas cuyo pH llega hasta 6.9 lo que indica deterioro, es aún apta para la elaboración de ensilajes pues el efecto de los ácidos controla la posterior descomposición.

Al añadir el ácido sulfúrico al 1.92 % v/p (48 ml), el pH descendió hasta 1.85, y una hora después, al añadir el ácido fórmico en proporción 0.5 % v/p (12.5 ml) el pH descendió solo a 1.7, estos resultados no fueron idénticos a los del primer ensayo (tabla 5), lo cual es fácil de explicar si se considera que el contenido de cenizas en este lote fue menor (tabla 14), de tal manera que el ácido añadido tiene menos material que neutralizar, ya que se ha encontrado que a las cenizas por encontrarse algunas como carbonatos tienden a subir el pH por reacciones de neutralización (Torrinsen y cols. 1981; Abazinge y cols., 1993).

Las variaciones de pH a partir de las 12 horas fueron prácticamente nulas, a partir de los 18 días comienza un ligero aumento del pH de 2.35 hasta 2.6, pero esto ocurrió en el periodo comprendido entre los 18 días hasta el día 60. Estos cambios tan ligeros de pH confirman la estabilidad microbiológica y pudieron deberse por un lado a la neutralización de carbonatos presentes en las cenizas y a posibles reacciones de desaminación que producen amoníaco y por ende afecta el pH (Haaland y Njaa, 1989; Viana y cols., 1993). Respecto a las variaciones de

la materia prima en cuanto al contenido de cenizas, esto repercute directamente en el gasto de ácido pues al comparar el pH de los ensilajes del primer ensayo a los 35 días (tabla 14) el pH era de 2.98 mientras que para el presente ensayo a los 35 días resultó de 2.5 habiéndose gastado en este caso un poco menos de ácido fórmico, (ver la discusión del pH en el primer ensayo).

La variabilidad de la materia prima puede ser reducida si los lotes utilizados son mas grandes, lo cual resulta muy complicado en este estudio por los problemas de transporte de las muestras, sin embargo, aún en trabajos en los que se trabaja con lotes grandes pues los experimentos se realizan en el mismo lugar de la captura, la variabilidad puede seguir presentándose debido a las variaciones climatológicas que influyen sobre la alimentación y ciclo sexual entre otras variables (Hardy y Masumoto, 1991; Jeckel y cols., 1991; Aranson, 1994).

Tabla 15
Comportamiento del pH durante 60 días

Tiempo	Ensilaje Control	Ensilaje con BHT al 0.02 %
0*	6.1	6.1
	1.85 ¹	1.85 ¹
1 hora	1.7 ²	1.7 ²
12 h	2	2
24h	2.1	2.1
3 días	2.1	2.1
7	2.2	2.2
9	2.2	2.2
11	2.2	2.2
18	2.35	2.35
20	2.4	2.4
23	2.4	2.4
30	2.5	2.5
35	2.55	2.55
40	2.6	2.6
45	2.6	2.6
60	2.6	2.6

* Materia prima

¹ Adición de 48 ml de H₂SO₄ concentrado.

² Adición de 12.5 ml de ac fórmico concentrado.

5.2.3 Nitrógeno no proteínico y actividad enzimática

Los niveles de NNP al inicio son de 24.61 % del NT y para los 8 días prácticamente se duplicó, los cambios entre el día 8 y el 20 fueron menores de tal manera que a los 8 días podría pararse la hidrólisis, si se considera que los cambios son de poca importancia (figura 8). Los resultados obtenidos en este experimento fueron muy similares a los obtenidos en el primer ensayo (figura 6) lo cual demuestra la reproducibilidad del proceso de hidrólisis. Los resultados de este parámetro en materia prima y ensilajes se muestran en las tablas 16 y 17 respectivamente.

Tabla 16

Nitrógeno total, soluble y no proteínico de la materia prima

g de N/100g de muestra

	Nitrógeno total	N. Soluble	NNP
Mezcla 4:1	3.47 ± 0.17	1.17 ± 0.005	0.85 ± 0.0027

Triplicados

Figura 8
Evolución de nitrógeno no proteínico

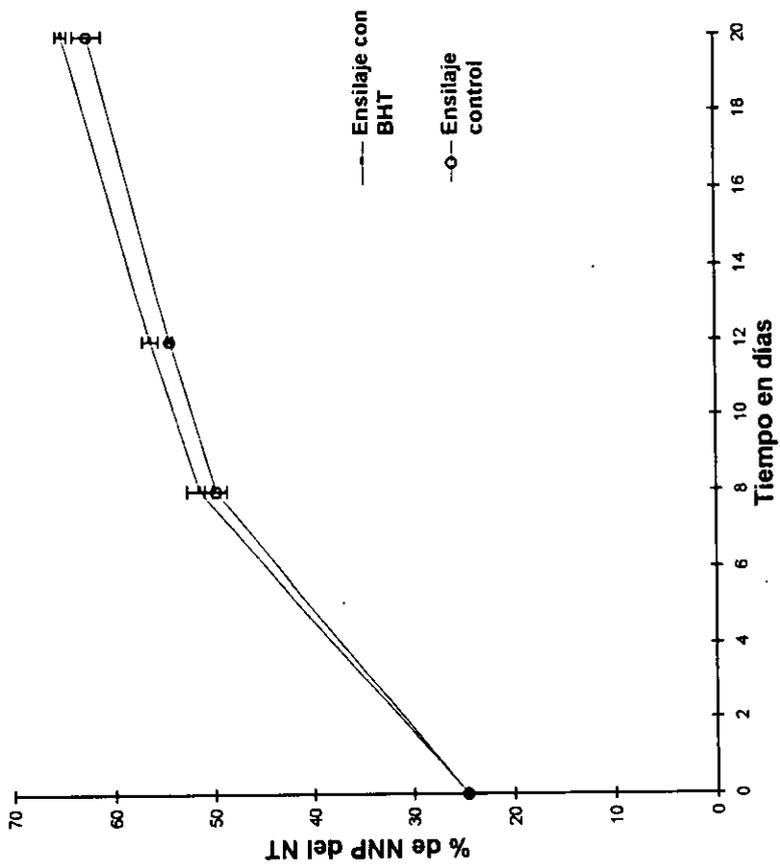


Tabla 17

Evolución del nitrógeno no proteínico en los ensilajes durante 20 días*g de NNP/100 g de NT*

Muestra	Día 0	Día 8	Día 12	Día 20
Materia prima	24.61 ± 0.007			
Ensilaje con BHT al 0.02%		51.4 ± 1.28	56.26 ± 0.78	64.9 ± 0.56
Ensilaje control		49.76 ± 1.1	54.32 ± 0.28	62.39 ± 1.41

Triplicados

El NNP está directamente relacionado con el estado inicial de las enzimas en la materia prima, en algunos trabajos (Lindgren, 1983; Viana y cols., 1993) en los que se ha monitoreado la actividad proteasa durante el proceso, se observa una disminución en la actividad enzimática cuando esta se determina respecto a un sustrato de hemoglobina, sin embargo en estos trabajos la materia prima estaba constituida de pescado entero fresco, el cual aporta diferentes enzimas (pepsinas y catepsinas) de las cuales algunas presentan cierto grado de actividad en el pH al que se preparan los ensilajes lo que puede ocasionar que se ataquen entre sí disminuyendo su actividad, sin embargo cuando se preparó un ensilaje utilizando únicamente víscera de bacalao se observó que la actividad de las enzimas extraídas seguía prácticamente sin cambió aún después de 9 días respecto al valor presentado en la víscera al inicio, en este último caso la

disminución en la velocidad de solubilización del ensilaje se atribuyó mas bien a que el sedimento que permanece en el ensilaje, se encuentra compuesto de proteína indigestible que no permite el acceso a las enzimas, estos trabajos sugieren que en un ensilaje como el del presente trabajo en el que las únicas enzimas presentes en forma activa deben ser del tipo de la pepsina, la actividad de estas puede permanecer estable aún cuando la producción de NNP ya alcanzó la meseta, sin embargo esos parámetros no fueron determinados en este trabajo por no considerarse de interés para los objetivos planteados en el mismo. En otros trabajos en los que se le han añadido bromelina al ensilado se ha encontrado que la hidrólisis se ve notablemente acelerada (80 % de NNP en 3 días) a pesar de que el ensilado estaba hecho de vísceras, sin embargo esto se explica debido a que el pH al que se elaboraron los ensilajes fué de 5.5, el cual se aleja del óptimo de las pepsinas de los peces (Tomé y cols., 1995)

Considerando que la actividad enzimática proviene básicamente de la víscera (pues la carne negra está cocida) se decidió montar el método de Anson (1939) para medir la actividad proteolítica, la cual es de suponer que proviene principalmente de la pepsina.

Siguiendo la definición de Lindgren y Pleje (1983) en la que la actividad proteolítica se reporta como la cantidad de unidades de actividad por gramo de ensilaje (en este caso de víscera), en la que se considera a una unidad de actividad como la cantidad de enzimas que liberan 1 μmol de tirosina en 10 min. y basándose en los últimos puntos de la curva (figura 9) que es donde la desviación estándar fue menor, se encuentra que la víscera utilizada en este experimento

presentó 15.308 UA/g de víscera, bajo las condiciones de extracción empleadas. Los contenidos de proteína analizados por el método de Lowry se muestran en la tablas 18 y 19, y los resultados del ensayo de actividad proteolítica se observan en la tabla 20.

Tabla 18
Contenido de proteína al extracto de víscera
(Dilución 1:10 del extracto original)

	$\mu\text{g de proteína/ml}$	Abs
Repetición # 1	83.58	0.197
Repetición # 2	79.67	0.188
Repetición # 3	85.74	0.202

Media=82.99* $\mu\text{g de proteína/ml}$

D.E=3.076

C.V=3.70

- * Esta cantidad de proteína proviene de 0.01 g de muestra, por lo que cada gramo de muestra original proporciona 8.299 mg de proteína (8299 $\mu\text{g de proteína}$).

Tabla 19

Diluciones del extracto de víscera en buffer citrato-fosfato a pH=3
empleadas para la prueba de actividad

ml de extracto original/25 ml de buffer	g de muestra/ml	mg de Proteína/ml
0.2	0.0008	0.0066
0.4	0.0016	0.01327
0.6	0.0024	0.01991
0.8	0.0032	0.02655
1.0	0.004	0.03319

Tabla 20

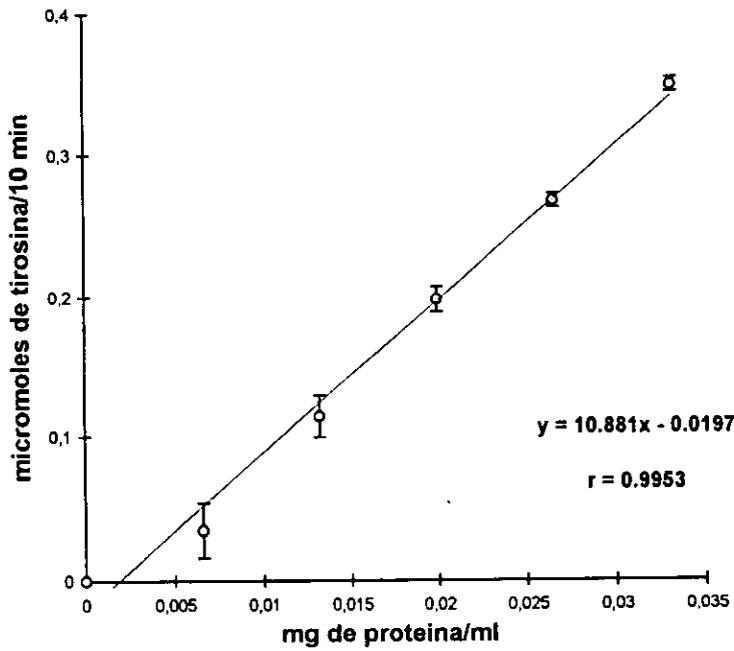
Mediciones de actividad proteolítica al extracto de víscera

μmol de Tir producidos en 10 min.*

Dilución mg de proteína/ml	Abs Curva # 1	Abs Curva # 2	μmol de Tir Curva # 2 (Media)
0	0	0	0
0.0066	0.031	0.056	0.0345 ± 0.0189
0.01327	0.109	0.128	0.114 ± 0.0148
0.01991	0.191	0.203	0.198 ± 0.0092
0.02655	0.258	0.264	0.2675 ± 0.0049
0.03319	0.333	0.340	0.348 ± 0.0049

* Tir=Tirosina

Figura 9
Curva de actividad proteolitica



5.2.4 Trimetilamina

La concentración de trimetilamina se comporta prácticamente de manera constante (figura 10), presentando un valor de 7.05 mg de N-TMA/ 100 g de muestra y después de 2 meses, existen trabajos donde esta tendencia también se observa, e incluso en ensilajes de macarela después de 120 días ya no eran detectadas cantidades de TMA cuando se había partido de un material que presentaba 5 mg de N-TMA/g de NT (Haaland y Njaa, 1988). Con esto es posible confirmar que la conservación aún a los 2 meses, continua siendo efectiva.

La posibilidad para el aumento de TMA cuando el ensilaje está bien preservado microbiológicamente lo constituye la acción de enzimas presentes en la musculatura oscura de algunos peces (Borgstrom, 1961) sin embargo, es muy posible que el efecto del calentamiento en la planta las haya inactivado. Los resultados se muestran en la tabla 21.

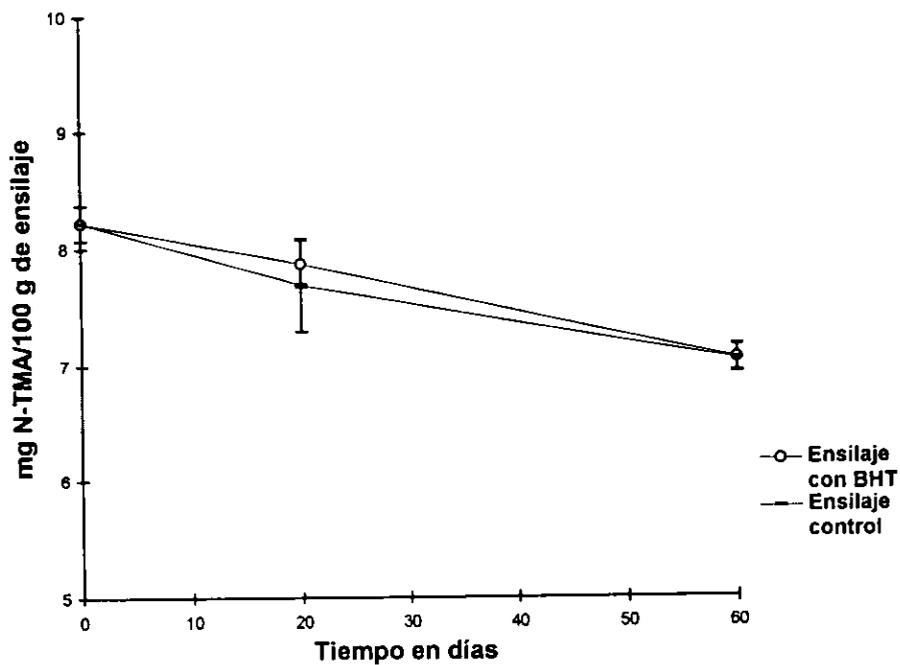
Tabla 21

Comportamiento de la trimetilamina durante 60 días de ensilaje
mg de N-TMA/100g de muestra

Muestra	Día 0	Día 20	Día 60
Mezcla 4:1	8.22 ± 0.15		
Ensilaje con BHT al 0.02 %		7.87 ± 0.02	7.06 ± 0.12
Ensilaje control		7.69 ± 0.39	7.05 ± 0.12

Triplicados

Figura 10
Trimetilamina en los ensilajes durante 60 días



5.2.5 Oxidación de la grasa

Los valores de malonaldehído en la materia prima mostrados en la tabla 22, indican que esta ya se encontraba oxidada ya que esta presentaba valores de 102 mg de malonaldehído/kg de muestra, este pescado había sido mantenido en congelación en la planta antes de ser procesado lo cual hace pensar que este tipo de material normalmente se obtiene oxidado puesto que después de la captura se mantiene a -20 °C por periodos que llegan a ser de meses, es por esta razón que el antioxidante no surtió el efecto deseado, ya que el efecto de éste es en las primeras etapas de la oxidación, la cual una vez que inicia ya no es controlada. El ensilaje que contenía el antioxidante presentó prácticamente los mismos valores que el ensilaje control (tabla 23).

Tabla 22

Número de ácido tiobarbitúrico en las materias primas* por separado

Muestra	mg de Malonaldehído/kg de muestra
Carne negra	208.32 ± 6.12
Viscera	7.58 ± 0.25

Triplificados

* Estas materias primas se habían mantenido 15 días en congelación (-12°C).

Tabla 23

Número de ácido tiobarbitúrico en los ensilajes durante 60 días

mg de malonaldehído/kg de muestra

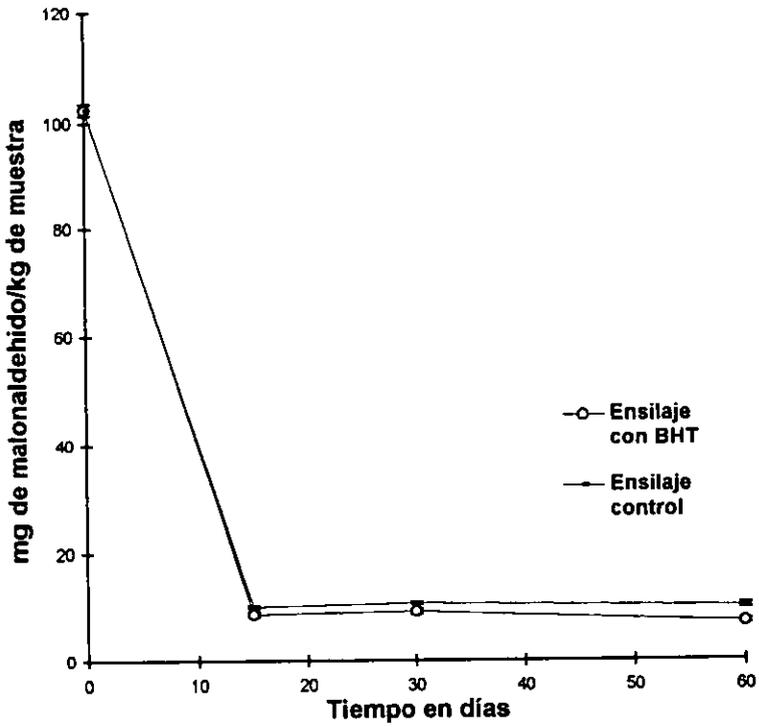
Muestra	Día 0	Día 15	Día 30	Día 60
Materia prima*	102.48 ± 1.099	148.15 ± 8.26		
Ensilaje con BHT al 0.02 %		8.59 ± 0.48	9.16 ± 0.526	7.09 ± 0.36
Ensilaje control		10.01 ± 0.24	10.77 ± 0.25	10.23 ± 0.49

Triplicados

*Esta materia prima corresponde a la mezcla 4:1 (carne negra:viscera) antes de acidificarse.

Por otro lado aunque en algunos trabajos se recomienda el uso del método del ácido tiobarbitúrico para medir la oxidación de los ensilajes (Uvalle, 1983; Haard y cols., 1985; Aranson, 1994) el método no aportó suficiente información ya que como se observa en la tabla 23 que el único valor que se acerca a la realidad fue el de la materia prima (mezcla 4:1 a tiempo cero) con un valor de 102 mg de malonaldehído/kg de muestra, pues al realizar la medición a los ensilajes al día 15 los valores detectables de malonaldehído habían descendido drásticamente (figura 11) lo cual se podría explicar por la reactividad de este producto con proteínas y aminoácidos (Buttkus y Bose, 1972) entre los que se consideran más susceptibles está el grupo amino de la lisina, además de que si consideramos que en este punto

Figura 11
Número de ácido tiobarbitúrico en los ensilajes durante
60 días



del proceso ya se tiene mas del 50 % de la proteína en forma de aminoácidos libres o péptidos no precipitables es de imaginar que además de la lisina otros aminoácidos pueden reaccionar (Jadhav y cols., 1996). Este drástico descenso sugirió que se repitieran los análisis a la materia prima , la cual se había mantenido esos 15 días en congelación (-12°C) al, igual que a las materias primas por separado (tabla 22), encontrándose que la mezcla 4:1 (carne negra:viscera), en vez de disminuir sus valores, los había aumentado a 148 mg de malonaldehído/kg, lo que confirma que en los ensilajes el malonaldehído no es detectable totalmente por el método empleado, estos resultados coinciden perfectamente con los obtenidos por Hall y Ledward (1985), quienes realizaron determinaciones de malonaldeído con el método del ácido tiobarbitúrico empleando destilación, a pesar de esto, observaron que al igual que en el presente trabajo la materia prima presentó valores mucho mas altos que los valores de los ensilajes después de 4 días.

En el caso de las materias por separado se encontró que era la carne negra la aportadora en mayor parte de los productos de oxidación, esto hace suponer que, aunque la viscera también está en congelación en la planta es posible que por estar cubierta por toda la musculatura del pescado se impida su contacto con el oxígeno del aire, retardándose la oxidación, aunque por otro lado su contenido de grasa también es menor (ver tabla 4). Cabe mencionar que la principal fuente de malonaldehído es la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados, los cuales son característicos en pescado (Ackman, 1989), los fosfolípidos se relacionan con los ácidos grasos poliinsaturados sobre todo en su

posición *sn-2*, en el caso particular del atún aleta amarilla el 56.71 % en peso de sus lípidos son fosfolípidos siendo este el valor mas alto encontrado entre otras 8 especies de atún (Aubourg y cols., 1996).

Las dificultades para el transporte de las muestras no permitieron conocer el estado inicial del aceite en las materias primas con mayor exactitud lo cual hace interesante la posibilidad de estudiar el estado de los lípidos del atún desde las etapas iniciales de su procesamiento a nivel de planta.

5.2.6 Comentarios sobre la prueba de secado

En las pruebas de secado se seleccionó la proporción 70:30, ya que se pudo secar sin problema a 40°C en un tiempo de alrededor de 10 horas, la proporción 60:40, aunque presentaba mayor consistencia y esto facilitaba el secado, presentaba el inconveniente de que el contenido de proteína resultaba mas bajo y además el volumen final era mayor lo cual puede complicar su transporte, además se eligió la proporción 70:30 y una temperatura a 40°C, porque esta temperatura se asemeja a las condiciones de secado al sol, las cuales se han reportado con éxito en algunos trabajos (Uvalle, 1983; Bigueras-Benitez y cols, 1992).

En el caso de la proporción 85:15 tratada a 80°C, se secó rápidamente en menos de 8 hr sin embargo un proceso de secado de este tipo puede aumentar los costos al proceso.

5.2.7 Lisina disponible

La materia prima, la cual había sido liofilizada después de la molienda, presentó un valor de lisina disponible de 5.27g/100 g de proteína mientras que el ensilaje liofilizado después de 20 días de incubación, presentó un valor de 4.85g/100g de proteína (ver tabla 24), esto indica que el grado de hidrólisis alcanzado a los 20 días (ver tabla 17), el cual fué casi el 65 % y el grado de oxidación del ensilaje (ver tabla 23), al parecer no tuvieron mayor efecto sobre la biodisponibilidad de la lisina. Aunque los valores de malonaldehído detectados en la materia prima llegaban a 102.48 mg/kg de muestra al momento de la liofilización y el valor detectable en los ensilajes había descendido drásticamente a menos de 10 mg/kg entre los días 15 y 30, esto sugiere que aunque muy posiblemente el malonaldehído se puede encontrar unido a algunos aminoácidos, entre los cuales figura como el principal la lisina por su grupo ϵ -amino tan reactivo; esto hace pensar que la interacción no es tan fuerte como para ocasionar una disminución mayor, la cual solo fue del 8 %. Jadhav y colaboradores (1996) menciona que el malonaldehído es altamente reactivo y que reacciona con el grupo amino de los residuos de la lisina en una proteína ocasionando puentes cruzados intermoleculares; sin embargo Backhoff (1976) encontró que en el ensilajes de arenque almacenados a 5°C, 15°C y 30°C, la lisina disponible no presentó variaciones en los ensilajes con respecto a la materia prima, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Tabla 24

Contenido de lisina disponible en la materia prima, ensilaje liofilizado y producto seco

	Materia prima	Ensilaje liofilizado a 20 días de almacenamiento	Ensilaje+sorgo (85:15)
Lisina disponible (g/100g de proteína)	5.27	4.85	5.25

5.2.8 Triptofano

En la tabla 25 se observa que hubo un cambio muy notable en el contenido de triptofano de los ensilajes después de 20 días de incubación, el cual presentó valores de 0.44 mg/100 g de proteína, comparando el valor que presentó la materia prima antes de ser acidificada, que fue de 0.74 mg/100 g, se observa que hubo una pérdida de triptofano del 39.3 % del total en los 20 días de almacenamiento.

Tabla 25

Contenido de triptofano en la materia prima y en el ensilaje liofilizado

Muestra	g de triptofano/100 g de proteína
Materia prima	0.74 ± 0.023
Ensilaje con 20 días de almacenamiento	0.44 ± 0.004

Backhoff (1976), realizó uno de los primeros estudios con estos materiales encontrando pérdidas del 25 % en ensilajes de bacalao a pH 3.9 después de 54 días a 30°C y de 33 % de pérdida de triptofano para ensilajes de arenque, cabe mencionar que las pérdidas en ensilaje de arenque empezaron a notarse desde los 20 días, mientras que en ensilajes de bacalao, las pérdidas fueron muy ligeras durante los primeros 20 días. Uvalle (1983), encontró en ensilajes de fauna de acompañamiento de camarón pérdidas de 27 % esto, ocurrido durante los primeros siete meses de almacenamiento y el pH había fluctuado de 3.5 a 4.

Aunque el triptofano se considera inestable a pH bajos, su inestabilidad es mayor si se encuentra en estado libre comparado a cuando se encuentra formando parte de una proteína (Jackson, 1984a). Sin embargo aunque en el presente trabajo la hidrólisis de la proteína fue solo un 65 % de NNP (ver tabla 17) comparado con los casos anteriores en que se presentaba hasta un 80 % de NNP (Backhoff, 1976, Uvalle, 1983), las pérdidas de triptofano fueron mayores, lo cual se puede explicar por el pH tan bajo que se alcanzó en este ensayo (ver tabla 15), sin embargo estos resultados sugieren que se reduzca el tiempo de almacenamiento o la acidez.

5.2.9 Minerales

Los resultados de minerales se muestran en la tabla 26, y se puede observar que, como era de esperarse los resultados entre la materia prima y los ensilajes no tuvieron prácticamente ninguna diferencia, cabe destacar que las

cantidades de fósforo y calcio son considerables, lo cual constituye un factor interesante ya que estos minerales son de gran importancia en dietas de pollos, para la formación de hueso y plumas NRC (1994), por otro lado hay que mencionar que la cantidad de sodio resulta alta, lo cual podría resultar una limitante al momento de incluir el producto en dietas, ya que para poder eliminarlo se aumenta el consumo de agua y se puede disminuir el consumo de alimento, llegando incluso a presentarse diarrea.

Tabla 26

Contenido de minerales en la materia prima y en el ensilaje liofilizado

mg/100 g de muestra

Mineral	Materia prima	Ensilaje liofilizado con 20 días de incubación
Zinc	7.78	7.78
Fósforo	843	866.88
Hierro	37.63	38.9
Calcio	1087	1362
Potasio	1003	985.5
Sodio	1059	1227

5.3 Resultados y discusión de la etapa 3

(Obtención del ensilaje a nivel de planta piloto y su evaluación nutricia en pollos de engorda)

5.3.1 Composición del producto seco (ensilaje + sorgo)

Se encontró que el procedimiento empleado para secar el producto a nivel de planta piloto, resultó adecuado puesto que la mezcla seca solo presentó un 5 % de humedad lo cual le da condiciones para que no se contamine con hongos. La concentración de proteína resultó de 28.27 % lo que lo sitúa perfectamente para formular dietas de pollo de engorda cuyos requerimientos son de 22 %, en el caso de que toda la proteína pueda ser proporcionada por la mezcla seca. Los contenidos del extracto etéreo, cenizas y fibra fueron de 10.9, 9.32 y de 0.99 % respectivamente, el extracto libre de nitrógeno calculado por diferencia resultó de 45.47 %. La composición del producto se muestra en la tabla 27. Al realizar la determinación de minerales se encontró que el producto presentó un alto contenido de sodio lo cual limitó que el producto pudiera ser incorporado en mayores niveles (tabla 28).

Tabla 27

Composición proximal del producto seco ensilaje+sorgo (70:30) obtenido a nivel de planta piloto

Humedad	Proteína	Extracto etéreo	Cenizas	Fibra	Extracto libre de nitrógeno
5.01 ± 0.01	28.27 ± 0.09	10.94 ± 0.15	9.32 ± 0.007	0.99 ± 0.04	45.47*

*Por diferencia

Tabla 28

Contenido de minerales al producto seco ensilaje+sorgo (70:30)
mg/100 g de muestra

Mineral	Ensilaje+sorgo
Calcio	1147.6
Fósforo	1069.6
Sodio	1612.0

Aunque el concepto de cómputo químico se utiliza para expresar el valor de una proteína cuando ésta se utiliza para nutrición humana, en el presente estudio se utilizó este cálculo para identificar cuál era el aminoácido limitante, que resultó ser el triptofano, ya que la mezcla ensilaje + sorgo aporta solo 0.15 % de

triptofano de la dieta, sin embargo la soya aporta el 0.62 % (NRC,1984), lo cual puede complementarlo ya que el requerimiento de este aminoácido para pollo de iniciación se ha estimado en 0.2 % de la dieta (NRC 1994). Cabe mencionar que posiblemente, como el tiempo de almacenamiento se redujo a solo 8 días, las pérdidas de este aminoácido no resultaron tan altas como las del segundo experimento a nivel laboratorio, además de que el sorgo también aporta parte del triptofano. En general el perfil de aminoácidos de la mezcla ensilaje + sorgo resultó adecuado como se muestra en la tabla 29, cubriendo casi totalmente los requerimientos del pollo.

Tabla 29

Aminoácidos del producto seco ensilaje+sorgo (70:30)

Aminoácido	Contenido en g/100g de proteína	Patrón de la FAO¹	Cómputo químico
Metionina	2.27		
Cisteína	1.01		
M+C	3.28	3.50	93
Lisina	5.87	5.44	>100
Treonina	3.92	4.00	98
Valina	4.61	4.96	92
Leucina	7.27	7.04	>100
Isoleucina	3.67	4.00	91
Triptofano	0.54 ± 0.013	1.00	54
Ac. Aspártico	8.17		
Ac. Gutámico	13.07		
Alanina	6.73		
Glicina	7.34		
Serina	3.96		
Arginina	5.40		
Prolina	5.22		
NH ₃	1.73		

¹ Patrón de aminoácidos de la FAO (1973)

5.3.2 Ganancia en peso, consumo de alimento y conversión alimenticia

Se observa que los pollos de los 4 tratamientos (0, 5, 10,y 15 % de inclusión) presentaron una ganancia de peso aceptable, con una ligera tendencia del tratamiento 2 (5 % de inclusión) a tener un mayor peso como se observa en las tabla 30 y 31; sin embargo, el análisis estadístico demuestra que esta tendencia no fue significativamente diferente de las otras dietas ($p > 0.05$). Los análisis estadísticos se muestran en el anexo 9.

Tabla 30

Incremento semanal de peso en los pollos alimentados con diferentes niveles de ensilaje

Tratamiento	Peso inicial	Peso 1ª Semana	Peso 2ª Semana
0 %	170.3 ± 4.10	384.9 ± 3.14	690.2 ± 6.50
5 %	173.3 ± 5.34	406.4 ± 1.15	715.0 ± 0.98
10 %	175.5 ± 2.17	374.7 ± 2.43	692.8 ± 2.10
15 %	178.0 ± 3.46	405.6 ± 0.75	677.3 ± 1.20

Tabla 31

Resultados de 14 días de evaluación biológica del ensilaje con pollos de engorda

Tratamiento	Ganancia en peso (g/pollo)	Consumo de alimento (g/pollo)	Conversión alimenticia (g alim./gan.)	Consumo de agua* (ml/ave/día)
0 %	519.8 ± 61.30	757.50	1.45	173.0 ± 18.80
5 %	541.7 ± 6.80	809.10	1.49	190.0 ± 11.55
10 %	517.2 ± 16.00	749.08	1.52	169.0 ± 12.26
15 %	499.3 ± 15.50	794.80	1.57	169.5 ± 13.80

*Evaluación realizada los últimos 2 días de experimentación.

Por otro lado en lo referente al consumo de alimento y la conversión alimenticia no hubo diferencia estadística entre los tratamientos. En la figura 12, se puede observar que el consumo de alimento, aunque tampoco presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ninguno de los tratamientos, presentó pequeñas diferencias numéricas en algunos, lo cual se puede explicar porque las aves de algunos tratamientos ganaron un poco más de peso y por ende esto estuvo ligado a un mayor consumo de alimento.

En la figura 13 se muestran las curvas de crecimiento de los pollos durante los 14 días de experimentación y se puede apreciar que las curvas son muy similares con una mínima tendencia del tratamiento 2 a presentar mayor ganancia de peso, sin ser esta significativa estadísticamente.

Figura 12
Consumo de alimento durante 14 días
usando distintos niveles de ensilaje de atún
(Mezcla ensilaje+sorgo)

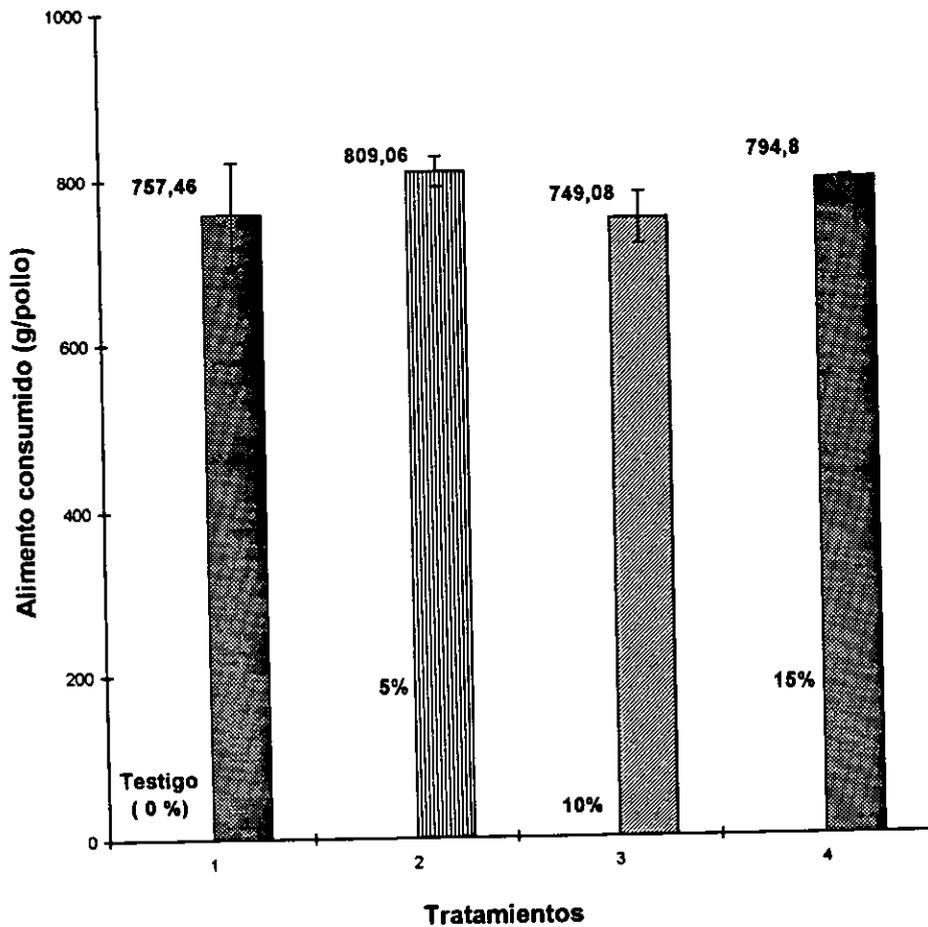
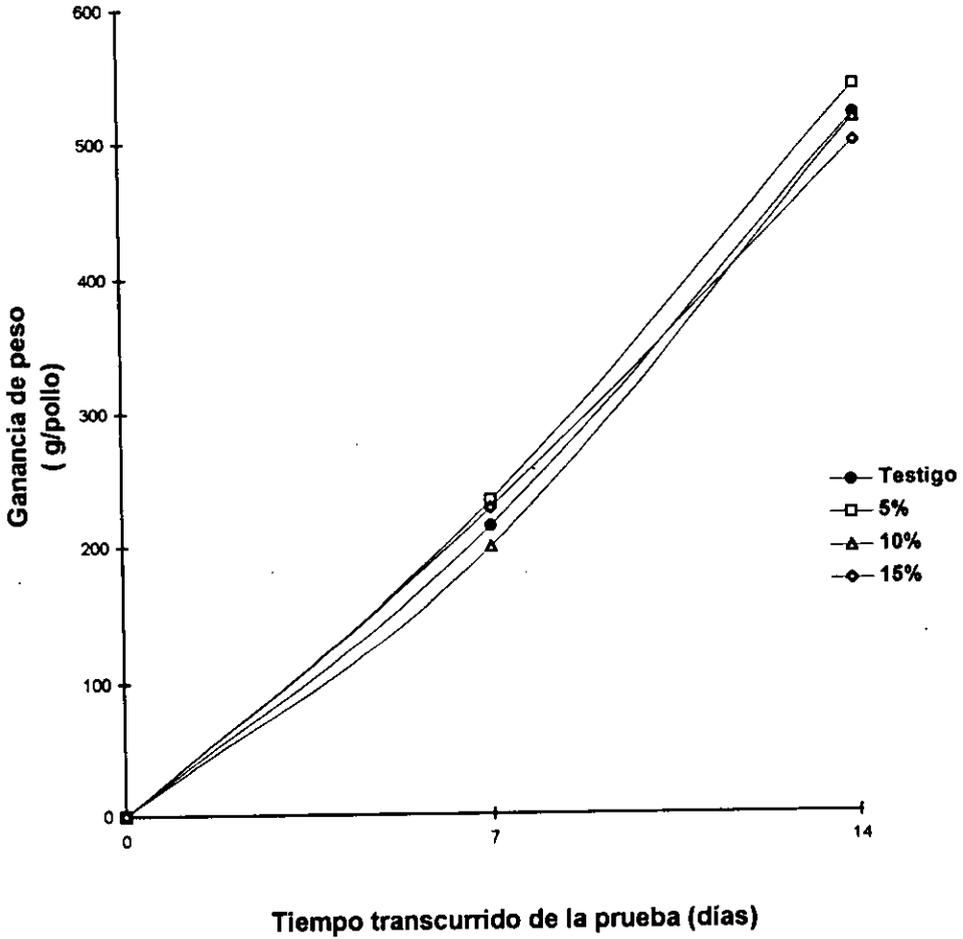


Figura 13
Curva de crecimiento de los pollos usando distintos niveles de
ensilaje de atún
(Mezcla ensilaje+sorgo)



En trabajos previos Jonhson y colaboradores (1985) probaron ensilajes elaborados tanto por vía ácida como por vía fermentativa en niveles de 25, 50, y 100 kg/ton., obteniendo buenos resultados de crecimiento; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las dietas respecto a los 2 controles empleados cuyo contenido de proteína estaba aportado principalmente por soya y harina de pescado respectivamente en los controles 1 y 2. Estos resultados coinciden perfectamente con los obtenidos en este trabajo. Posteriores estudios mostraron que la mejor ganancia en peso se obtuvo cuando el ensilaje de pescado aportaba el 20 % del contenido de la proteína la cual substituía la harina de pescado, sin embargo las diferencias tampoco fueron significativas (Espe y cols., 1992), Cabe mencionar que en estos trabajos así como en el presente estudio se ha notado una mejora del crecimiento de los pollos cuando se les incluye en la dieta proteína hidrolizada, esto hace pensar que puede ser ventajoso que una parte de la proteína se encuentre en forma soluble, lo que puede ocasionar que se absorba mas rápidamente y entre a formar parte de la síntesis de la proteína en el pollo en un tiempo mas corto (Espe y cols., 1989).

Ávila y Balloun (1974) emplearon harina de anchoveta peruana a niveles de 0, 2, 4, 6 y 8 % en lugar de proteína de soya, encontrando que aún cuando parece haber un ligero incremento en los pesos cuando se sustituye el pescado por la soya a niveles de 4, 6 y 8 % las diferencias no fueron significativas ni tampoco en la conversión alimenticia. En relación a la calidad de la harina de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) como fuente de proteína para pollo existen pocos reportes, Balogun y colaboradores (1986) evaluaron en pollos la harina de

atún barrilete (*Katsuwonus pelamis*) en niveles de inclusión de 0 y 6 % contra un alimento comercial, obteniendo buenos resultados en cuanto a ganancia de peso, conversión alimenticia y rendimiento en canal así como formación de proteína, de este resultado se concluyó que la utilización de esta harina podía abaratar los costos en relación a la dieta comercial, sin embargo se comentó la gran cantidad de cenizas que presenta esta harina.

En la parte final de esta tesis se hacen algunas recomendaciones que podrían tomarse en cuenta para optimizar el uso de los subproductos generados en el procesamiento del atún con fines de alimentación animal.

5.3.3 Mortalidad

La mortalidad de los pollos en estudio estuvo dentro de los rangos normales, casi la totalidad de los que murieron fue por ascitis, solo uno de los pollos presentó además de la ascitis infección de saco vitelino. Por otro lado no se presentó mortalidad en ninguna de las réplicas del tratamiento 4, el cual presentaba el nivel más elevado de inclusión del ensilaje (15 %).

5.3.4 Consumo de agua durante el experimento

Durante los primeros días de experimentación se evaluó el consumo de agua manera visual y se observó que algunas de las réplicas siempre presentaban una menor cantidad de agua en su bebedero, en comparación con

otras que tenían el bebedero con bastante agua. Esto sugirió medir el volumen del agua que consumía cada réplica, esta medición se realizó en los últimos dos días del experimento y los resultados mostraron que el consumo de agua no tuvo mucha variación a excepción del tratamiento 2 en el cual se consumió mas agua, lo cual se puede explicar por el hecho de que los pollos de este tratamiento ganaron mas peso que los demás (estas mediciones se muestran en el anexo 10) .Sin embargo se observó que el sodio presente en las dietas, el cual provenía principalmente del producto seco ensilaje+sorgo, no afectó el consumo de agua por la necesidad de eliminarlo.

6- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo se concluye lo siguiente:

1. Los subproductos generados en el proceso del enlatado del atún poseen buenas características en cuanto a composición proximal y calidad de la proteína como para ser utilizados en alimentación de pollos.
2. El tratamiento de estos subproductos en forma de ensilaje ácido, utilizando una mezcla de ácido fórmico y sulfúrico, constituye una posibilidad para ser utilizados en alimentación de pollos de engorda.
3. El producto se puede obtener en un periodo de ocho días a temperatura ambiente en zonas costeras.
4. La mezcla fórmico+sulfúrico en proporciones de 1.92 y 0.5 % respectivamente, resulta adecuado para preservar el producto dándole una calidad microbiológica adecuada.
5. La utilización de la mezcla ensilaje húmedo+sorgo en proporción de 70:30 respectivamente resulta adecuada para secar el ensilaje húmedo a temperatura de 40 °C en un tiempo de alrededor de 10 horas, estas condiciones son muy similares a las condiciones ambientales en zonas costeras en donde se genera este subproducto por lo que la posibilidad del secado al sol puede considerarse viable, ya que la naturaleza ácida del producto impide el desarrollo de los microorganismos.

6. Aunque el proceso presentó la desventaja de la pérdida de triptofano, esta desventaja se puede ver disminuida conforme el tiempo de almacenamiento es reducido.
7. La lisina, a pesar que se considera que una gran parte de ella se encuentra en estado libre y que en el ensilaje se encuentran presentes productos de oxidación de las grasas como lo es el malonaldehído, la biodisponibilidad de la lisina se ve solo reducida en un 8 %, lo cual no ocasiona problemas en el desarrollo de pollos de engorda.
8. Finalmente se concluye que el producto seco final, puede ser incluido en dietas para pollos de engorda en niveles de hasta un 15 %, sin que se afecte su conversión alimenticia y sin encontrar efectos adversos en el desarrollo de las aves, haciendo de éste producto un ingrediente adecuado e inocuo para pollos de engorda.

Recomendaciones:

En vista de que una limitante para aumentar los niveles de inclusión de este producto en dietas para pollos de engorda, es su alto contenido de algunos minerales, se considera conveniente estudiar la posibilidad de reducirlos, lo cual podría consistir en un proceso sencillo, ya que durante el enlatado, existe una etapa en que se separa la carne blanca de lo que constituye el subproducto y esto se hace manualmente, es en esta etapa en la que se podría separar fácilmente y sin mayor costo la cabeza, la cual constituye la porción mas grande del esqueleto

y que está conformada básicamente por minerales. Esto podría en primer lugar, aumentar la concentración relativa de proteína y a su vez reducir su contenido de minerales, lo cual le daría mayor valor al producto que se obtenga de estos desperdicios; sobre todo si se emplea para alimentación animal.

Al material separado, el cual tendría una alta concentración de minerales se le podrían buscar alternativas precisamente como fuente de minerales ya sea para alimentación animal o como fertilizante, por otro lado el disminuir el contenido de cenizas en los subproductos reduce directamente la cantidad de ácido requerido para preservar el material, lo cual abarataría el proceso del ensilaje.

Sin embargo, es posible que el alto contenido de sodio presente en el subproducto sea mas bien debido, a que en el procesamiento que recibe el pescado en la planta, este es conservado en agua salada, de tal manera que para tratar de reducir el contenido de este mineral, se tendrían que buscar otro tipo de mecanismos, relacionados a las etapas posteriores a la conservación en agua salada.

En lo referente a la oxidación de la grasa, la cual está oxidada ya desde que el material es cocido en la planta o quizá desde las etapas de congelación, se podría considerar la posibilidad de estudiar que tan efectivo es un antioxidante en las primeras etapas después de la captura, lo cual aumenta las posibilidades para controlar la oxidación y para obtener un aceite de mayor valor desde el punto de vista nutricional.

Finalmente, el hecho de que estos subproductos involucren las vísceras en estado fresco con alto contenido de enzimas como la pepsina, hace pensar que la extracción de esta proteasa puede ser en un momento dado una industria derivada de la industria atunera, el ensilaje representa un proceso sencillo que podría ser considerado para la extracción de enzimas tal como ha sido instalado en Noruega para extracción de pepsina de bacalao a escala industrial.

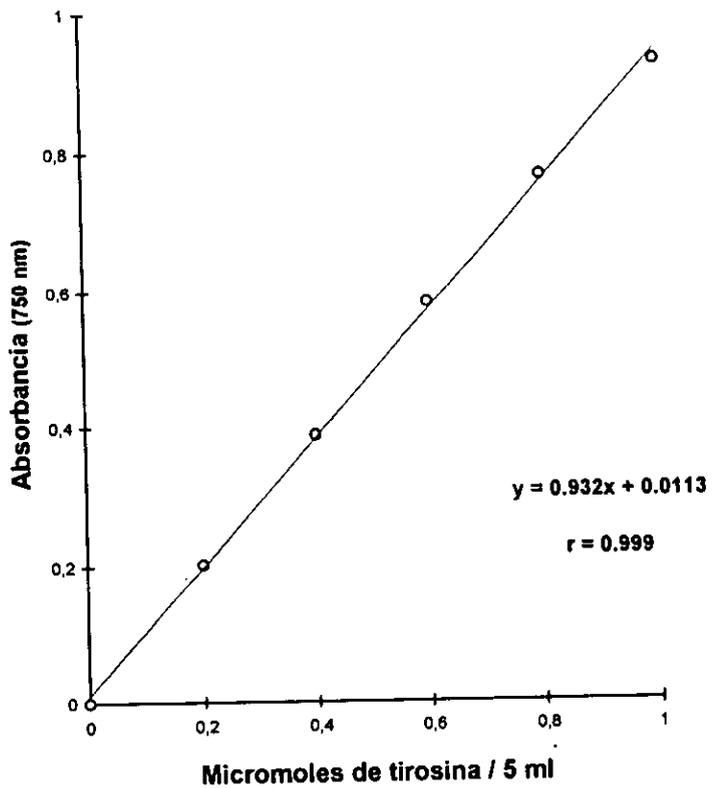
7- ANEXOS

Anexo 1

Etapas del ensayo de actividad enzimática proteolítica

1. Se tomó 1 ml de cada dilución de extracto enzimático y se mezcló con 5 ml de la solución de hemoglobina, se dejaron incubar a 37 °C durante 10 min.
2. La hidrólisis se detuvo con 10 ml de ac tricloroacético al 5 %, y el contenido de los tubos se filtró utilizando papel Whatman # 542.
3. Se tomaron 5 ml de cada filtrado y se mezclaron con 10 ml de NaOH 0.498 N.
4. Se añadieron 3 ml de reactivo de fenol diluido (1 ml con 2 ml de H₂O destilada).
5. Se le midió la absorbancia a 750 nm, los resultados se expresan como micromoles de tirosina producidos durante 10 min por mg de proteína. Para conocer los micromoles de tirosina, se extrapolan los valores de absorbancia a una curva estándar de tirosina con concentraciones de 0 a 1 μmol de tirosina/5 ml, la curva se muestra en este mismo anexo.

Curva estándar de tirosina



Anexo 2

Preparación de la muestra y medición de la proteína por el método de Lowry

1. Se prepararon diluciones que contenían entre 50 y 200 μg de proteína/ml, Se mezcló 1 ml de estas soluciones con 1 ml de H_2O destilada.
2. Se precipitó la proteína con 1 ml de ac. tricloroacético 3 M. Se centrifugó por 10 min a 3000 r.p.m. El sobrenadante se eliminó y el sedimento se resuspendió con 1 ml de NaOH 0.01 N.
3. A cada muestra se le añadieron 5 ml de la mezcla A (ver reactivos en esta misma página), se mezcló y se dejó a temperatura ambiente por 10 min. Luego se añadieron 0.5 ml de la mezcla B y al cabo de 30 min se les midió la absorbancia a 578 nm. En el caso del blanco se utilizó 1 ml de agua destilada en vez de solución de proteína y al mismo tiempo que se analizaban las muestras se preparó una curva estándar de albúmina bovina la cual se muestra en este mismo anexo.

Reactivos

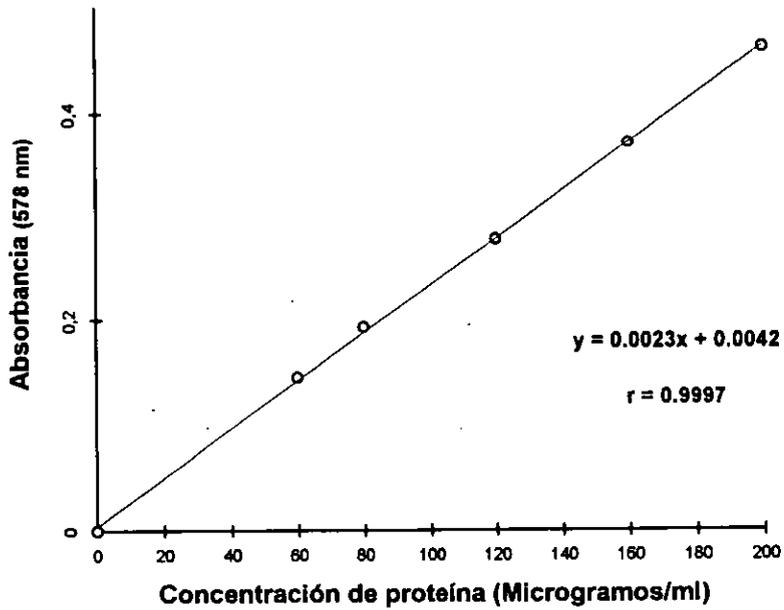
Solución ①: de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y Tartrato de sodio y potasio ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$). 2 g de Na_2CO_3 anhidro y 20 mg de $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron y aforaron a 100 ml con NaOH 0.1 N

Solución ②: de CuSO_4 . 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ se disuelven en 10 ml de H_2O

Mezcla A: Se preparó con 1 ml de la solución ② y 50 ml de la solución ①.

Mezcla B: Se preparó por dilución de 5 ml de el reactivo de Folin Ciocalteau con 9 ml de H_2O destilada.

**Curva estándar de albúmina bovina
para el método de Lowry**



Anexo 3

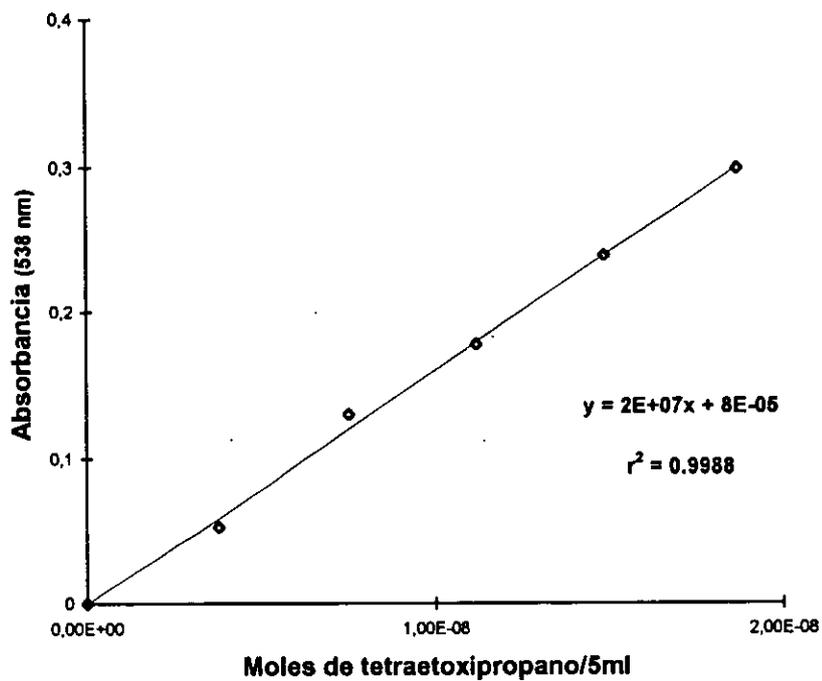
Etapas del método del ácido tiobarbitúrico:

1. La muestra de ensilaje se preparó al 2 % p/v en ácido tricloroacético al 7.5 % v/p, se homogenizó y luego se filtró en papel Whatman No. 541.
2. Se tomaron alícuotas entre 1 y 5 ml del filtrado y se colocaron en un tubo con tapa de rosca, el volumen se llevó a 5 ml con agua destilada.
3. Luego se añadieron 5 ml de ácido tiobarbitúrico (ATB) 0.02 M y se colocaron en un baño de agua hirviendo por 45 minutos.
4. Después de este tiempo se enfriaron al chorro del agua y se leyeron a 538 nm dentro de los primeros 30 minutos.
5. El blanco se preparó igual que los problemas, excepto que en lugar de utilizar 5 ml de filtrado se utilizaron 5 ml de agua.

Preparación de la curva

1. Se preparó utilizando un estándar de tetraetoxipropano (TEP) de Sigma, la cual se llevó a una concentración final de 9.8×10^{-6} M (solución de trabajo).
2. De la solución de trabajo se tomaron alícuotas de 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, y 2 ml y se llevaron a 5 ml con agua destilada, luego se añadió el reactivo de TBA y se continuó igual que para las muestras. Esta curva se muestra en este anexo.

Curva estándar de tetraetoxipropano para el método del ácido tiobarbitúrico



**Porcentaje de recuperación de tetraetoxipropano
para el método del ácido tiobarbitúrico**

1. Para comprobar que el porcentaje de recuperación de esta técnica era adecuado, se mezcló a 1 g de muestra de ensilaje* con 6 ml de solución de trabajo de tetraetoxipropano (TEP), dicha solución de trabajo había sido preparada a una concentración de 5.35×10^{-5} M (Esta se determinó por el mismo método).
2. Se tomaron 6 ml de esta solución de trabajo y se llevaron a 50 ml, luego se tomó un ml de esta dilución y se le aplicó el método. La concentración molar dentro de la celda fue de 6.42×10^{-7} M $\pm 2.34 \times 10^{-8}$.
3. La mezcla de ensilaje + solución de TEP se homogeneizó y se aforó a 50 ml con TCA y luego se filtró.
4. Del filtrado se tomó 1 ml y se procesó igual que las muestras.
5. La cantidad de malonaldehído en las muestras de ensilaje se determinó que era de 41.88 mg/Kg de muestra, lo cual correspondía a una concentración Molar dentro de la celda espectrofotométrica de 1.16×10^{-6} M, de tal manera que la concentración Molar esperada para la muestra ensilaje + TEP dentro de la celda espectrofotométrica era de 1.802×10^{-6} M ($= 1.16 \times 10^{-6} + 6.42 \times 10^{-7}$).

* Esta muestra de ensilaje se había elaborado durante la primera etapa experimental por lo que cuando esta técnica se montó, los ensilajes ya tenían 6 meses almacenados a 37 °C.

Oxidación de lípidos en ensilaje después de 6 meses de almacenamiento

Repetición	Concentración en moles de malonaldehído/L según la curva	Concentración en mg de malonaldehído/ kg. de muestra
1	5.75×10^{-8}	41.4
2	6.10×10^{-8}	43.56
3	5.80×10^{-8}	41.76
4	5.70×10^{-8}	41.04
5	5.80×10^{-8}	41.76
6	5.80×10^{-8}	41.76

Media= 41.88 mg/kg

D. E= 0.87

C.V=2.08

Nota: Las muestras se prepararon con 1 g de muestra en 50 ml de TCA al 7.5 % y tomando 1 ml del filtrado

Resultados de la prueba de recuperación

Muestra Ensilaje+TEP	Concentración dentro de la celda	% de recuperación
1	1.73×10^{-6}	96.0
2	1.65×10^{-6}	91.56
3	1.67×10^{-6}	92.67
4	1.71×10^{-6}	95.32
5	1.67×10^{-6}	92.6
6	1.59×10^{-6}	88.23

Media=92.73 %

D.E= 2.79

C.V=3.01

Anexo 5

Etapas del método de trimetilamina

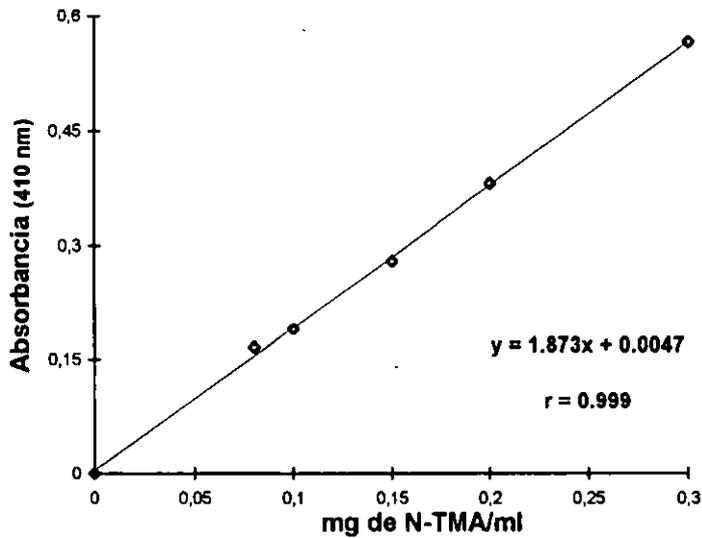
1. Se obtuvieron extractos de los ensilajes con ácido tricloroacético al 7.5 %. Se tomaron muestras de 5 g de ensilaje y se homogeneizó con TCA, luego fueron aforados a 50 ml. Se filtraron con papel Whatman No. 541 y se tomaron 2 ml del filtrado. Las alícuotas de los filtrados fueron colocadas en tubos con tapón esmerilado
2. Se llevó a un volumen de 4 ml con H₂O destilada. Para el blanco se utilizaron 4 ml de H₂O destilada
3. Se añadió 1 ml de formaldehído al 20 %. Se añadieron 10 ml de tolueno y luego 3 ml de K₂CO₃ (preparado al 100 % con H₂O). Se tapó el tubo y se agitó.
4. Se retiraron entre 7 y 9 ml de la capa de tolueno y se colocaron en tubos que contenían 0.1 g de Na₂SO₄ anhidro para secar el tolueno.
5. Se retiraron 5 ml del tolueno seco, se colocaron en tubos y se añadieron 5 ml de ácido pícrico (solución preparada en tolueno). Se determinó la absorbancia a 410 nm contra el blanco.

Preparación de la curva

6. Se preparó una solución estándar de hidrocloreuro de trimetilamina (CH₃)₃N HCl. 0.682 g + 1 ml de HCl (1+3) luego se diluyó a 100 ml con agua destilada. A esta solución se le determinó su concentración de nitrógeno por el método de micro-kjeldahl (AOAC.1990), para corroborar su concentración.

7. La solución de trabajo se preparó con 1 ml de la solución estándar mas un ml de HCl (1+3) luego se llevó a 100 ml con agua destilada.
8. De la solución de trabajo se tomaron porciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 ml y se llevaron a 4 ml. Luego fueron tratados igual que las muestras. Esta curva se muestra en este mismo anexo.

Curva estándar de trimetilamina



Anexo 6

Nitrógeno total de los ensilajes durante los 35 días

Representados como porcentaje de la muestra

	Día 1	Día 2	Día 4	Día 10	Día 20	Día 35
Ensilaje con fórmico	2.81 ± 0.096	2.78 ± 0.087	2.76 ± 0.05	2.90 ± 0.06	2.87 ± 0.07	2.94 ± 0.11
Ensilaje fórmico + HCl	2.69 ± 0.047	2.7 ± 0.027	2.77 ± 0.02	2.91 ± 0.05	2.82 ± 0.027	2.86 ± 0.039
Ensilaje fórmico+H₂SO₄	2.85 ± 0.08	2.72 ± 0.05	2.73 ± 0.03	2.85 ± 0.06	2.8 ± 0.007	2.85 ± 0.039

Anexo 7

Evolución de la proteína solubilizada .

Calculada a partir del nitrógeno soluble y el factor 6.25

	Día 2	Día 4	Día 10	Día 20	Día 35
Ensilaje	11.18 ± 0.25	11.29 ± 0.31	12.52 ± 0.31	12.87 ± 0.37	13.62 ± 0.56
fórmico solo					
Ensilaje	9.18 ± 0.25	9.56 ± 0.06	11.75 ± 0.37	12.12 ± 0.43	13.11 ± 0.26
fórmico + clorhídrico					
Ensilaje	9.87 ± 0.06	9.91 ± 0.04	11.75 ± 0.08	12.12 ± 0.31	12.81 ± 0.23
fórmico + sulfúrico					

Anexo 8

Análisis estadístico del NNP entre tratamientos

Análisis de varianza para los resultados de NNP obtenidos el día 10

Diseño aleatorio

Fuente de variación	G.L.	S.C	C.M	F. calculada	F de tablas		
					5%	1%	
Tratamientos	2	161.2	80.60	95.95	5.14	10.92	**
Error	6	5.07	0.84				
Total	8	166.27					

Diseño en bloques

Fuente de variación	G.L.	S.C	C.M	F. calculada	F. de tablas		
					5 %	1 %	
Tratamientos	2	161.20	80.60	63.71	6.94	18.00	**
Repeticiones	2	0.00807	0.004	0.0031	6.94	18.00	**
Error	4	5.06	1.265				
Total	8	166.27					

$$\text{Eficiencia relativa} = \frac{\text{C.M. error d.a.} (G.L. \text{ error d.b} + 1)(G.L. \text{ error d.a.} + 3)}{\text{C.M. error d.b} (G.L. \text{ error d. b.} + 3)(G.L. \text{ error d.a.} + 1)}$$

$$\text{C.M. error d.b} (G.L. \text{ error d. b.} + 3)(G.L. \text{ error d.a.} + 1)$$

$$\text{E. relativa} = \frac{0.84 (4+1) (6+3)}{1.265 (4+3) (6+1)} = 0.609$$

$$1.265 (4+3) (6+1)$$

Prueba de rango múltiple (Duncan)

$$D=Q (Sx)$$

$$Sx= \sqrt{CM \text{ del error}/r}$$

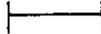
r= número de repeticiones

$$Sx= \sqrt{0.84/3} =0.5291$$

Duncan

$$D (2 \text{ medias})= 3.46 (0.529) =1.8306$$

$$D (3 \text{ medias})=3. 58 (0.591) =1.89$$

fórmico+H₂SO₄	fórmico+HCL	fórmico solo
56.33	58.46	67.37
		

Se concluye en base al diseño aleatorio que:

Hay diferencia altamente significativa en los tratamientos en relación a la cantidad de NNP obtenido a los diez días de almacenamiento, siendo mayor en el ensilaje elaborado con ácido fórmico sólo.

Análisis de varianza para los resultados de NNP obtenidos el día 20

Diseño en bloques

Fuente de variación	G.L.	S.C	C.M	F. calculada	F. de tablas		
					5 %	1 %	
Tratamientos	2	6.94	3.47	0.62	6.94	18.0	N.S
Repeticiones	2	12.11	6.055	1.094	6.94	18.0	N.S
Error	4	22.13	5.53				
Total	6	41.18					

Eficiencia relativa: 1.42

Se concluye en base al diseño en bloques que:

No hay diferencia significativa en ninguno de los tres tratamientos en relación a la cantidad de NNP obtenido a los 20 días de almacenamiento

Análisis de varianza para los resultados de NNP obtenidos el día 35

Diseño en bloques

Fuente de variación	G.L.	S.C	C.M	F. calculada	F de tablas		
					5 %	1 %	
Tratamientos	2	56.58	28.29	15.80	6.94	18	**
Repeticiones	2	7.32	3.66	2.04	6.94	18	**
Error	4	7.19	1.79				
Total	8	71.095					

Eficiencia relativa=1.23

Prueba de rango múltiple de Duncan.

$D=Q (S_x)$

$$S_x = \sqrt{1.79/3} = 0.77$$

$$D (2 \text{ medias}) = 3.93 (0.77) = 3.028$$

$$D (3 \text{ medias}) = 4.01 (0.77) = 3.087$$

fórmico+H₂SO₄

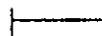
fórmico+HCL

fórmico solo

70.14

70.58

75.66



Se concluye en base al diseño en bloques que:

Hay diferencia altamente significativa de los tratamientos en relación a la cantidad de NNP obtenido a los 35 días de almacenamiento, siendo mayor para los ensilajes elaborados con ácido fórmico solo.

Anexo 9

Análisis estadístico de la prueba biológica

Análisis de varianza de la ganancia en peso durante todo el experimento

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P>F
Tratamientos	3	2714.00	904.666	0.9853	0.538
Bloques	2	3372.50	1686.25	1.8366	0.238
Error	6	5508.75	918.125		
Total	11	11595.25			

C.V. 5.83 %

Análisis de varianza del consumo de alimento/pollo durante todo el experimento

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P>F
Tratamientos	3	4369.5	1456.5	0.9873	0.539
Bloques	2	2165.0	1082.5	0.7338	0.521
Error	6	8851.0	1475.16		
Total	11	15385.5			

C.V.= 4.87 %

**Análisis de varianza de la conversión alimenticia durante todo el
experimento**

Fuente de variación	G.L	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P>F
Tratamientos	3	0.029355	0.009785	3.6654	0.083
Bloques	2	0.005516	0.002758	1.0331	0.413
Error	6	0.016018	0.002670		
Total	11	0.050890	0.002670		

C.V.= 3.41 %

Los tratamientos fueron considerados las dietas (0, 5,10, 15% de inclusión) y se puede observar que no hubo diferencia significativa en ninguno de estos tratamientos en ninguno de los parámetros que fueron evaluados

En el presente estudio, se demuestra que con precauciones adecuadas en el manejo de la materia prima y en la elaboración del ensilaje, este producto puede ser incorporado en dietas balanceadas para pollos de engorda en etapa de iniciación, sin presentarse efectos adversos en el crecimiento de los pollo ni en la palatabilidad, cuando se incluyó en la dieta, en niveles de hasta el 15 % de la mezcla ensilaje+sorgo (70:30).

Anexo 10

Consumo de agua durante el experimento

Réplica	Rango en el consumo de agua (ml /24 horas) por pollo	Media global del tratamiento
1R1 (9)	180-204	173 ± 18.8
1R2 (10)	155-165	
1R3 (8)	156-182	
2R1 (10)	185-199	190 ± 11.55
2R2 (9)	174-186	
2R3 (9)	191-207	
3R1 (10)	149-166	169 ± 12.26
3R2 (8)	167-182	
3R3 (9)	182-168	
4R1 (10)	165-155	169.5 ± 13.8
4R2 (10)	175-180	
4R3 (10)	188-154	

Nota: El número dentro del paréntesis corresponde al número de aves por réplica

BIBIOGRAFIA

- ◆ Abazinge, M. D. A., Fontenot, J. P. Allen V. G. y Flick G. J. (1993). Ensiling characteristics of crab waste and wheat straw treated with different additives. *J. Agric. Food. Chem.*, (41): 657-661.
- ◆ Ackman, R. (1989): Fatty acids. in *Marine Biogenic Lipid, Fats and Oils*. Ackman, R. (ed.), CRC Press: Boca Raton, Fl. Vol I, p. 103-137. citado por Aubourg (1996).
- ◆ Akeson, W. B. y Stalerman, M. (1964): A pepsin-pancreatin digest index of protein quality. *J. Nutr.*, (83): 257-261.
- ◆ Anglesea, J. D. y Jackson, A. J. (1985): Thiaminase activity in fish silage and moist fish feed. *Animal Feed Science and technology*, (13): 39-46
- ◆ Anónimo: *Anuario Estadístico de Pesca* (1995). SEMARNAP. Primera edición, Noviembre 1996. p. 20-26.
- ◆ Anson, M.L. (1938).The estimation of pepsin, tripsin papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiology*, (22): 79-89.
- ◆ AOAC (1990). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Herlich, K (editor). 15 th Vol 1 & II Arlington. p 17, 69, 84-88 y 869,
- ◆ Aranson, S. (1994): Produccion of fish silage, In: *Fisheries processing: biotechnological applications*. Editado por . Martin., A. M. Chapman & Hall, London. 245-271.
- ◆ Aubourg, S. P., Medina Y. y Pérez Martín, R. (1996): Polyunsaturated fatty acids in tuna phospholipids. Distribution in the sn-2 location and changes during cooking. *J. Agric. Food Chem.*, (44): 585-589.
- ◆ Ávila, G. E. y Balloun, S. L. (1974): Effects of anchovy fish meal in broiler diets. *Poultry Science*, (53): 13-72.
- ◆ Ayala, F. M. Gerente de Producción en: *Productos Pesqueros de Mazatlán, S.A. de C.V.* Comunicación personal. Diciembre de 1995.
- ◆ Backhoff, H. P. (1976): Some chemical changes in fish silaje. *J. Food Technol.*, (11): 353-356.
- ◆ Báez, Fernández M. (1980): Extracción y determinación de la actividad de pepsina proveniente del estómago de pescado lisa (*Mugil cephalus L.*). *Tesis de Maestría*. Escuela de Ciencias Marítimas y Alimentarias, ITESM. Guaymas, Sonora, México.

- ◆ Balogun, A. M., Talabi, S. O., Sorinmade, S. O. y Roberts, O. (1986): Biological evaluation of the nutritive quality of fish meal produced from tuna (*Katsuwonus pelamis*) wastes. *Nutrition Reports International*, Vol. 34, (1): 35-49.
- ◆ Belitz, H. D. (1993): Interactions and reactions involved in food processing. In: *Encyclopedia of food science, food technology, and nutrition*. Macrae, R., Robinson, R. K., y Sadler, M. J. (Eds.). Academic Press London. p. 3818-3819.
- ◆ Belitz, H.D. (1988): *Química de los Alimentos*. Editorial Acribia, p. 491-502.
- ◆ Bello, R. A. y Brito, L. (1994): Obtención del ensilado biológico de pescado. *Archivos Latinoamericanos de Nutr.*, Vol 4 (4): 264-269.
- ◆ Bello, R. A. y Fernández Y. (1995): Evaluación del ensilado biológico de pescado en pollos de engorde. *Archivos Latinoamericanos de Nutr.* 45 (2). 134-139.
- ◆ Bello, R. A. y Fernández, Y. (1993): Estudio sobre la elaboración del ensilado biológico de pescado eviscerado. *Archivos Latinoamericanos de Nutr.*, 43 (3): 221-227.
- ◆ Bigueras-Benitez, C. M. y Nacorda, H. M. (1992). Evaluation of fish silage as protein source for poultry. *FAO Fisheries Report*, (470):148-153, Supl. Roma-Italy, FAO.
- ◆ Blig, E. C. y Dyer, W. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. and physiol.* 17, (3), 911-917.
- ◆ Boland, F. E. y Paige, D. D. (1971): Collaborative study of a method for the determination of trimethylamine nitrogen in fish. *Journal of the AOAC*, Vol 54, (3):725-727
- ◆ Borgstrom, G. (1961): *Fish as food*. Vol 1 Academic Press. Department of Food Science, Michigan State University. p. 335-375
- ◆ Buttkus, H. y Bose, R. J. (1972): Amine malonaldehyde condensation products and their relative color contribution in the TBA test. *J. of the American Oil Chemists Society*, (49): 440-443. citado por Hall (1986).
- ◆ Carpenter, K. J., Ellinger, M. E., Munto, M. Y. y Rolfe, E. J. (1957): The estimation of the available lysine in animal protein food. *Brit. J. Nutr.* (11): 162
- ◆ Dong, F. M., Fairgrieve, W.T. Skonberg, D.I. y Rasco, B. A. (1993): Preparation and nutrient analysis of lactic bacterial ensiled salmon viscera. *Aquaculture*, (109): 351-366.

- ◆ Doores, S. (1993): Organics acids. In: *Antimicrobials in foods*. Second edition, Davidson, P. M. y Branen, A. L. (Eds.) Serie Food Science and Technology, p. 121-124.
- ◆ Dyer, J. W. (1959): Report on trimethylamine in fish. *Journal of the AOAC*, Vol. 42, (2): 292-294.
- ◆ Espe, M., Haaland, H. y Njaa, L. R. (1992): Substitution of fish silage protein and a free amino acid mixture for fish meal protein in a chicken diet. *J. Sci. Food Agric.*, (58): 315-319.
- ◆ Espe, M., Raa, J. y Njaa, L. R. (1989): Nutritional value of stored fish silage as a protein source for young rats. *J. Sci. Food Agric.*, (49): 259-270.
- ◆ Fennema, O. R. (1993) *Química de los alimentos*. Editorial. Acibia segunda edición. p. 853-856.
- ◆ Gildberg, A. (1993): Review: Enzymic processing of marine raw materials, *Process Biochemistry*, (28): 1-15.
- ◆ Gildberg, A. y Raa, J. (1977): Properties of propionic acid/formic Acid preserved silage of cod viscera. *J. Sci. Food Agric.*, (28), 647-653.
- ◆ Gomori, G., (1955): Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: *Methods in Enzimology*, Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (Eds), Vol I p.138-146. (London academic press).
- ◆ Guillou, A., khalil, M. y Adambounou, L. (1995): Effects of silage preservation on astaxanthin forms and fatty acid profiles of processed shrimp (*Pandalus borealis*) waste. *Aquaculture*, (130). 353-360.
- ◆ Haaland, H. L. Njaa, R. 1989): Total volatil nitrogen- a criteion for fish silage?. *Acuaculture*, (79): 311-316.
- ◆ Haaland, H. y Njaa, L. R. (1988): Amonia (NH₃) and total nitrogen content (TVN) in preserved and unpreserved stored, whole fish. *J. Sci. Food Agric.*, (44): 335-342.
- ◆ Haard N. F. y Simpson, B. K. (1994): Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry, In: *Fisheries processing: biotechnological applications*. Editado por . Martin, A. M. Chapman & Hall, London. 132-153.
- ◆ Haard, N. F., Kariel, N., Herzberg, G., Woodrow, L. A. y Winter, K. (1985): Stabilisation of protein and oil in fish silage for use as a rumiant feed supplement. *J. Sci. food Agric.* (36): 229-241.

- ◆ Hall, G. M. y Ledward, D. A. (1986): Silage from tropical fish 3. Lipid behavior. *J. of Food Technology*, (21): 45-44.
- ◆ Hardy, R. W. Shearer, K. D. y Spinelli, J. (1984): The nutritional properties of co-dried fish silage in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) dry diets. *Aquaculture*, (38): 35-44.
- ◆ Hardy, R. W. y Masumoto, T. (1991): Especificaciones for marine by-products for aquaculture. In: *Proceedings of the Aquaculture Feed Processing and Nutrition-Workshop*, Akiyama, D. M. y Ronnie K. H. T. (Eds).Thailand and Indonesia, September 19-25. p. 99-108.
- ◆ Heras, H., McLeod, C. A. y Ackman, R. G. (1994): Atlantic dogfish silage vs.herring silaje for atlantic salmon (*Salmo salar*): growth and sensory evaluation of filets. *Aquaculture*, (125): 93-106.
- ◆ Hui, Y. W (Editor). *Encycyclopedia of Food Science and Technology*. A Wyley Interscience Publication. Vol II. 1992 USA.p. 910-948
- ◆ Husain, R. A. K. y Offer, N. W. (1987). Effect of formaldehyde treatment on the degradation of acid-preserved fish silage protein in vitro. *Animal Feed Science Technology*, (16): 297-304.
- ◆ ICMSF (1983). Microorganismos de los alimentos. *Técnicas del Análisis Microbiológico*. Editorial Acribia, 2a edición. Vol. 1, p. 129-141., 1983.
- ◆ Jackson, A. J., Kerr, A. K. y Bullock, A. M. (1984a): Fish silage as a dietary ingredient for salmon.I. Nutritional and storage characteristics. *Aquaculture*, (38): 211-220.
- ◆ Jackson, A. J., Kerr, A. K. y Bullock, A. M. (1984b): Fish silage as a dietary ingredient for salmon. II. Preliminary growth findings and nutritional pathology. *Aquaculture*, (40): 283-291.
- ◆ Jadhav, S. J., Nimbalkar, S. S., Kulkarni. A. D. y Madhavi, D. L. (1996): Lipid oxidation in biological and food systems. In: *Food antioxidants, Technological, toxicologicals and health perspectives*, p. 5-63.
- ◆ Jeckel, W. H., Aizpun de Moreno, J. E. y Moreno, V. J. (1991): Seasonal variation in the biochemical composition and lipids of muscle and caparace in the shrimp (*Pleoticus muelleri*) bate. *Comp. Biochem. Physiol.*, (98B): 261-266. Citado por Guillou (1991).
- ◆ Johnson, R. J., Brown, N., Eason, P. y Summer, J. (1985): The nutritional quality of Two types of fish silage for broilers chickens. *J. Sci. Food Agric.*, (36): 1051-1056.

- ◆ **Lall, S. P.** (1991). Nutritional value of fish silage in salmonid diets, paper presented at the *Fish Silage Workshop*, Delabbe, J. (Ed.), Nova Scotia, Canada, p. 63-74. citado por Aranson (1994)
- ◆ **Lapie, L. P. y Bigueras -Benitez, C. M.** (1992): Feedins studies on tilapia (*Oreochromis sp.*) using fish silage. *FAO Fisheries Report*, (470):165-177, Supl. Roma-Italy, FAO.
- ◆ **Lees** (1983): *Análisis de los alimentos*. Editorial Acribia 2a edición p 179.
- ◆ **Lindgren, S., y Pleje, M.** (1983):Silage fermentation of fish or fish waste products with lactic acids bacteria. *J. Sci. Food Agric.*, (34): 1057-1067
- ◆ **Lo, K. V., Liao, P.H. y Gao. Y.** (1993): Effects of temperature on silage production from salmon farm mortalities. *Bioresourse Technology*. (44), 33-37.
- ◆ **Macky, L. M.** (1982). General review of fish protein hidrolyzates. *Animal Feed Science and Technology*, (7): 113-124.
- ◆ **Macrae, R. K. Robinson, M. J. Sanler.** (Editor). *Encyclopaedia of Food Science and Technology and Nutrition*. Academic press.1993. p.1826-1903.
- ◆ **Martinez Hidalgo, J. M.** (1997). Diccionario de terminos empleados en embarcaciones. Ediciones Garriga, Barcelona España.
- ◆ **Merritt J. H.** (1982): Assessment of the produccion costs of fish protein hidrolyzates. *Animal Feed Science and Technology*, (7): 147-151.
- ◆ **Montgomery, D. C.** (1991): *Design and analysis of experiments*. Jonh Wiley & sons Inc. Third edition. p. 50-87.
- ◆ **Norris, R. y Mathies. J.** (1953): Preparation, properties, and cristalization of tuna pepsin. *J. Biol. Chem.* (204): 673-680.
- ◆ **NRC** (1984):*National Reseach Council*. Nutrient requirement of poultry, eighth edition, National Academic Press, p. 1-47.
- ◆ **NRC** (1994):*National Reseach Council*. Nutrient requirement of poultry, ninth edition, National Academic Press, p. 27-29.
- ◆ **Páez Delgado, R. O.** (1997):Mercado global del atún y embargo estadounidense, un caso de neoproteccionismo comercial. *EPESSA, SEMARNAP*, (Junio) p. 168-188.
- ◆ **Pérez, R.** (1995):Fish silages for Feeding livestock. *World Animal Rev.* (82).34-42.
- ◆ **Raa, J. y Gildberg, A.** (1976):Autolisis and proteolitic activity of cood viscera. *J. Food Technology*, (11): 619-628.

- ◆ **Raa, J. y Gildberg, A.** (1982): Fish silage: a review, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, abril: 383-347. citado por Aranson (1994).
- ◆ **Raghunath, M., R. y McCurdy A. R.** (1991): Synthesis of plasteins from fish silage. *J. Sci. Food Agric.*, (54): 655-658.
- ◆ **Rama Dao, M. V., Tara, M. R. y Kutty, C. H.** (1974): Colorimetric estimation of tryptophan contents of pulses. *J. of Food Sci. and Tech.*, Vol II (5): 213.
- ◆ **Recce, P.** (1980): Control and reduction of free fatty acid concentration in oil recovered from fish silage prepared from sprat. *J. Sci. Food Agric.* (31): 147-155.
- ◆ **Recce, P.** (1988): Recovery of proteasas from fish waste. *Process Biochemistry*, (Junio): 62-66.
- ◆ **Reece, P.** (1981): Recovery of high quality oil, from mackerel and sprat by the silage process. *J. Sci. Food and Agric.* (32): 531-538.
- ◆ **Rick, W, y Firtch, P.** (1974) Pepsin in: Methods of enzymatics analisis. Hans Ulrich Bergmeyer (Editor).English Academic Press, Inc, USA. Second edition. 171-179, 1046-1057.
- ◆ **Ritchie, A. H. y Mackie, I. M.** (1982): Preparation of fish protein hidrolyzates. *Animal Feed Science and Technology*, (7): 125-118
- ◆ **Rungruangsak, K. y Utne, F.** (1981): Effect of diferent acidified wet feeds on protease activities in the digestive tract and growth rate of rainbow trout (*Salmo gairdineru* Richardson). *Aquaculture*, (22): 67-79.
- ◆ **Samuels. W. A., Fontenot, J. P., Allen, V. G. y Abazinge M. D. A.** (1991): Seafood processing wastes ensiled with straw: Utilization and intake by sheep. *J. Anim. Sci.* (69): 4983-4992.
- ◆ **Scott, M. L., Nesheim, M. y Yong, R.J.** (1982): Proteins and aminoacids. In Nutrition of the chicken. Scott, M. L. and Associates, Ithaca, N. Y. p. 58-113.
- ◆ **Soliman, Y. K. Shenouda.** (1980) The theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. *Advances in Food Research*, (26): 277-307
- ◆ **Soria, F.** Gerente de Producción en: *Atunes y Derivados, S.A. de C.V.* Mazatlàn, Sinaloa. Comunicación personal. Abril de 1996.
- ◆ **Stone, F. E., Hardy, R. W. y Spinelli, J.** (1984): Autolysis of phytic acid and protein in canola meal (*Brassica spp.*) Wheat bran (*Triticum spp.*) and fish silage blends. *J. Sci. Food Agric.*, (35): 523-519.

- ◆ Stone, F. E. y Hardy, R. W. (1986): Nutritional Value of acid stabilised silage and liquefied fish protein. *J. Sci. Food Agric.*, (37): 797-803.
- ◆ Stone, F. E., Hardy, R. W., Shearer, K. D. y Scott T. M. (1989). Utilization of fish silage by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, (76): 109-118.
- ◆ Strasdine, G. A., Beames, R. M., Fisher, L. J. y Jones, Y. M. (1988): An assessment of ensiling the processing wastes from dogfish to produce a protein feed for monogastrics animals. *Can. J. Anim. Sci.* (68): 873-880
- ◆ Strom, T. y Raa, J. (1992): Ensiling of fish by acid lactic bacterial fermentation for feed production. *FAO Fisheries Report*, (470):142-147, Supl. Roma-Italy, FAO.
- ◆ Tanji, M., Kajeyama, T., Takahashi, K. (1988): Tuna pepsinogens and pepsin, purification, characterization and amino terminal secuencias. *Eur. J. Biochem.* (177): 251-259
- ◆ Tatterson I. N. y Windsor M. L. (1974): Fish Silage. *J. Sci. Food Agric.*, (25): 369-379.
- ◆ Tejada de H. Irma (1983): *Manual de laboratorio para el análisis de ingredientes utilizados en alimentación animal*. SARH-inip. p. 272-279
- ◆ Tomé, E., Levy, B. A. y Bello, R. (1995): Control de la actividad proteolítica en ensilado de pescado. *Archivos Latinoamericanos de Nutr.*, Vol. 45 (4): 317-321.
- ◆ Torrissen, O., Tidemann, E., Hansen, F. y Raa, J. (1981): Ensiling in acid - a method to stabilize astaxanthin in shrimp processing and improve uptake of this pigment by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, (26): 77-83.
- ◆ Uvalle A. (1983): Preparación y evaluación de ensilajes de varios desperdicios pesqueros y avícolas. *Tesis de Maestría*, Escuela de Ciencias Marítimas y Alimentarias ITESM, Guaymas, Sonora, México.
- ◆ Verburg, G. B. y Freeman, D. W. (1984): On-farm production of liquefied catfish protein. *Aquaculture*, (41): 171-179.
- ◆ Viana, M.T. , Nava Lopez C. y Solana Sansores R. (1993): Ensilajes ácidos de pescado. Efectos del precalentamiento y adición de ácido fosfórico y cítrico sobre la calidad bioquímica. *Ciencias Marinas*, 19 (4): 415-433.
- ◆ Vincke, W. (1970). Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette Seifen Anstrichmittel*, (72): Jargang, Nr. 12, 1080-1087.

- ◆ Wood, J. F., Carper, B. S. y Nicolaides, L. (1985): Preparation and evaluation of diets containing fish silage, cooked fish preserved with formic acid and low temperature-dried fish meal as protein sources for mirror carp(*Ciprinus carpio*). *Aquaculture*, (44): 27-40.
- ◆ Zuberi, R., Fatima, R., Shamshad, S. Y. y Qadri, R. B. (1992): Preparation of fish silage by microbial fermentation. *FAO Fisheries Report*, (470):155-164, Supl. Roma-Italy, FAO.