

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

OBTENCIÓN DE UN ENSILADO DE VÍSCERAS DE POLLO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

FABIOLA VÁZQUEZ GUDIÑO

MÉXICO, D.F.

2007



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 **Prof. Ángela Sotelo López**

Vocal **Prof. Lucía Gabriela Bascuñan Termini**

Secretario **Prof. Lucía Cornejo Barrera**

1er. Suplente **Prof. Leticia Gil Vieyra**

2do. Suplente **Prof. Gabriela López Velasco**

Sitio donde se desarrollo el tema:

Laboratorio 111. Departamento de Farmacia, conjunto E. Facultad de Química UNAM.

M. en C. Ángela Sotelo López

Asesor

M. en C. Rosa María Argote Espinosa

Asesor técnico

Fabiola Vázquez Gudiño

*Dedicado con mucho cariño
a mis padres y mis hermanos.*

Agradecimientos:

A Dios por darme la vida, por mostrarme el camino y por la fortuna de tener una familia como la mía.

A mis padres por todo su cariño, apoyo y comprensión, porque gracias a ellos he llegado hasta aquí y todos mis logros son parte de ellos.

A mis hermanos Mario y Janeth porque le han dado un toque especial a mi vida. Gracias por todos los momentos buenos y malos que hemos pasado juntos. Les agradezco todo su cariño y apoyo.

A mis Abuelitos, que me enseñaron con el ejemplo a amar a Dios y a mis seres queridos. Gracias por su cariño y por haber hecho de mi infancia la más maravillosa. Siempre los llevaré en el corazón.

A mi abuelito Sebastián, por su cariño y alegría y por sus pláticas tan amenas que siempre me enseñan algo nuevo.

A mis amigos de la universidad: Mire, Cecy, Karina, Maribel, Armando, Paco y Luis. Por su amistad, por todos los momentos que pasamos juntos. Siempre recordare con agrado nuestros días juntos en la universidad. Porque simplemente su amistad es un gran tesoro.

A Armando por tu amor y comprensión. Por tu amistad incondicional. Por enseñarme que con esfuerzo y dedicación todo se puede lograr. Gracias por creer en mí. Pero sobre todo, gracias por ser parte de mi vida y por dejarme ser parte de la tuya.

A mis maestras y compañeros del laboratorio 111. A Rosita, Lety, Iliana, Arge, Héctor, Mire, Gilda, Ale, Liz, Vane y Laura, por su ayuda en la realización de este trabajo y por los momentos tan amenos que pasamos juntos. A la señora Vicky, por su amistad, por sus pláticas tan agradables y por su alegría.

A la maestra Angela Sotelo, por su paciencia, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo y permitir complementar parte de mi educación y formación como profesionista. Gracias maestra.

A la maestra Rosita, por todo el apoyo brindado en la elaboración de este trabajo. Gracias por tus comentarios, opiniones y orientación. Pero sobre todo gracias por tu alegría que le da un toque especial a todos los que pasamos por este laboratorio.

A la maestra Lety, por tus comentarios y apoyo en la realización de este trabajo y muchas gracias por tu amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme cumplir uno de mis sueños y por ser parte importante en mi educación profesional.

Agradezco al jurado por sus valiosos comentarios en la realización de este trabajo.

Índice	Página
1. Introducción	2
2. Antecedentes	
2.1 Subproductos de la industria avícola	4
2.2 Ensilado: definición, clasificación y producción	6
2.3 Química del proceso de ensilaje	8
2.4 Implicaciones sanitarias de los ensilados	9
2.5 El uso de ensilados en la alimentación animal	10
3. Objetivos	13
4. Metodología	
4.1 Elaboración de ensilado a escala laboratorio	15
4.2 Materia prima	15
4.2.1 Acondicionamiento de la materia prima	16
4.3 Análisis bromatológico de la materia prima	16
4.4 Actividad enzimática	16
4.4.1 Obtención del extracto enzimático	17
4.4.1.1 Determinación de la actividad enzimática (μmoles de tirosina liberados en el extracto enzimático)	18
4.4.1.2 Determinación de la proteína en el extracto enzimático	21
4.5 Proceso de ensilaje	24
4.6 Parámetros monitoreados durante el proceso de ensilaje	25
4.6.1 pH	25
4.6.2 Avance en el proceso de hidrólisis del contenido proteínico	25
4.6.2.1 Determinación de nitrógeno no proteínico	25
4.6.2.2 Determinación de nitrógeno total	28
4.6.3 Determinación del grado de oxidación de la grasa	30
4.7 Análisis estadístico	33

5. Resultados y discusión	
5.1. Materia prima	35
5.2 Actividad enzimática	36
5.2.1 Determinación de μ moles de tirosina liberados en el extracto enzimático	37
5.2.2 Determinación de proteína en el extracto enzimático	39
5.3 Parámetros monitoreados	40
5.3.1 pH	40
5.3.2 Avance en el proceso de hidrólisis del contenido proteínico	42
5.3.3 Determinación del grado de oxidación de la grasa	44
6. Conclusiones	48
7. Bibliografía	50
8. Anexos	57

1. INTRODUCCIÓN

En México la avicultura representa la principal industria transformadora de proteína vegetal a proteína animal. Durante los últimos cinco años, la producción de carne de pollo en México ha crecido a un ritmo anual de 5.8%,(UNA, 2004) ya que en 2001 la producción era de 1 928 022.0 ton y en 2005 la producción fue de 2 436 534.2 ton.(SAGARPA, 2006). De esta producción alrededor del 18% lo constituyen los despojos generados después de la faena de la canal (vísceras, patas, cabezas, sangre), lo que constituye una buena fuente para la producción de ensilado como una posibilidad para su uso en la alimentación animal,

Actualmente el proceso de ensilaje ha permitido procesar exitosamente la mayoría de los desechos de origen animal y usarlos sin problemas como alimentos para animales. La preservación de forrajes, empleando un ambiente ácido (ensilaje) es una técnica cada vez mas común y que data de hace mucho tiempo. Existen trabajos de preservación de materias proteínicas usando medio ácido desde 1920 en Finlandia. Hoy en día se produce ensilado en países como Dinamarca, Finlandia, Polonia y algunos países de América Latina para alimentar a cerdos, aves y en acuicultura. Existen varias técnicas para la obtención del ensilado, ya sea por medios químicos o biológicos. El proceso de ensilaje es una técnica sencilla, que si se realiza de manera adecuada, resulta ser una alternativa económica de suplementación energética y proteínica en las dietas para la elaboración de alimentos para animales, ya que es una técnica que ha mostrado mantener el valor nutritivo de la materia prima, por lo cual se puede utilizar para sustituir fuentes tradicionales de proteínas en la alimentación animal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Subproductos de la Industria Avícola

Los subproductos no comestibles en la industria avícola están constituidos por el agua, el estiércol, aves muertas, plumas, sangre, vísceras y huevos, incluyendo huevos podridos e infecundos. Aunque muchos de estos productos siguen eliminándose como desperdicios, se ha avanzado considerablemente desde el punto de vista de su utilización. A continuación se mencionan algunos de los usos de dichos subproductos.

Estiércol de aves.

Actualmente, la depuración del estiércol de aves es probablemente la operación más ineficaz y de mayor costo en la producción y comercialización de aves. La necesidad de encontrar métodos prácticos y económicos para la depuración del estiércol es en la actualidad cada vez más urgente.

Varios investigadores han propuesto el desarrollo de nuevos usos para el estiércol de aves. El más importante y tradicional es su uso como fertilizante. Otros posibles usos son para su reutilización para lecho de aves, su inclusión en el pienso para ganado, su aplicación en la producción de gas. (**George**, 2001).

El valor fertilizante del estiércol de ave ha sido reconocido durante muchos años. **Burtner** (1959), realizó una serie de pruebas comparativas del poder fertilizante del estiércol desecado de vaca, oveja y ave, aplicado en concentraciones de 61, 122 y 244 kg por 100 m² para el crecimiento del césped. Como resultado observó un mayor crecimiento y un color verde más intenso en los terrenos tratados con estiércol de ave, comparados con los de estiércol de vaca y oveja.

El valor nutritivo del estiércol de ave varía considerablemente según las condiciones en que se produce y manipula. Además de nitrógeno, fósforo y potasio, el estiércol de aves contiene bajas cantidades de boro, calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, azufre y zinc. (**George**, 2001). Se han realizado diversas experiencias encaminadas a determinar el valor del estiércol de ave como forraje para el ganado. (**Noland y Ray**, 1956), publicaron los resultados obtenidos en pruebas realizadas en la alimentación de ovejas y corderos con heces conteniendo tallos de caña de azúcar troceados y cáscaras de cacahuate. Las heces contenían de 25 a un 30% de proteína bruta y suponían del 25 al 30 % del peso total de la ración. Las ovejas y corderos alimentados con raciones a base de heces y estiércol de aves, tuvieron el mismo

comportamiento que los alimentados con raciones en las que las heces se sustituyeron por harina de soya. En otras pruebas realizadas con novillos , los animales tenían que ingerir un 15% más de la dieta de heces para obtener los mismos resultados que si se alimentaban con raciones de harina de semilla de algodón.

Davis (1956) señaló que era posible la producción de carne de cerdo cuando en su alimentación se incluía un 50 % de heces de ave. La utilización de las heces de ave redujo los costos de la ración en un 60 %.

Plumas.

Las plumas son un subproducto de la industria avícola que puede aprovecharse en vestidos, aislamientos, camas, equipos deportivos, harinas de plumas y fertilizantes. La producción de harina de plumas es el proceso de mayor importancia comercial. Las plumas están constituidas de queratina, proteína que hay que degradar mediante hidrólisis para que tengan una mejor digestibilidad. La digestibilidad de la harina de plumas depende directamente del tiempo de cocción y de la presión (intensidad de la hidrólisis), consiguiéndose un mayor rendimiento en aminoácidos utilizables, de mayor valor biológico, cuando el proceso se hace intensivo. Las harinas de plumas son ricas en cistina, treonina y arginina, pero deficientes en cuatro aminoácidos esenciales: lisina, metionina, histidina y triptófano. Por ello, cuando las harinas de plumas se emplean en alimentación de animales monogástricos (pollos y cerdos) hay que suplementar los piensos con estos aminoácidos. El nivel práctico de empleo de las harinas de plumas en la dieta es del 0.5-1.5% (**Ockerman**, 1994).

Cáscaras de huevo.

Se han hecho algunos intentos de convertir las cáscaras de huevo en alimentos tanto para el hombre como para los animales, como fuente de calcio, especialmente en la alimentación de gallinas. Cuando se emplean como alimento humano se incorporan hasta en un 0.4 % en mezclas sin que se afecte la palatabilidad. El nivel de calcio en las raciones para gallinas es muy importante para mantener la calidad de las cáscaras. Las cáscaras de huevo sirven mejor que cualquier otra fuente de calcio para este fin. (**Ockerman**, 1994).

Sangre y despojos.

En los despojos se incluyen las cabezas, las patas y vísceras (tracto intestinal, pulmones, bazo, tráquea y órganos reproductivos). La sangre puede utilizarse para alimentar peces, como fertilizante y en la fabricación de harina de sangre. Los despojos cocidos se emplean en la cría doméstica de animales de peletería, en animales domésticos, incubadoras de peces, alimentos para cerdos y como fragmentos cárnicos para la alimentación de aves y otros animales (**George**, 2001).

Las vísceras de los animales de abasto como el pollo contienen proteínas que difieren en su composición de aminoácidos de un órgano a otro, destacando el hígado sobre los demás en cuanto a riqueza de aminoácidos esenciales. Además, las proteínas del hígado superan a las de las carnes en fenilalanina, leucina y valina, aunque son inferiores en isoleucina, lisina y metionina.

La grasa es uno de los nutrientes que presenta mayor fluctuación según la región de la canal, aun dentro de las mismas especies. Son notables las diferencias de composición entre la grasa de la carne y las grasas incluidas en las vísceras, donde se encuentra una mayor riqueza de ácido araquidónico, posiblemente por la mayor presencia de fosfolípidos. Las grasas aportan ácidos grasos esenciales y también son vehículos de vitaminas liposolubles, especialmente de vitamina A. Las vísceras son fuentes destacadas de vitaminas liposolubles. Así, el hígado viene a ser la principal fuente dietética de vitamina A, aunque también abunda en el tejido adiposo. Por otro lado tenemos que las vísceras son fuentes muy pobres en Mn, Mg y Cu, siendo el hígado carente de este último. (**Anchía**, 2000).

2.2 Ensilado: definición, clasificación y producción.

De manera general el proceso de ensilaje se puede definir como un método de preservación de forrajes húmedos, residuos agrícolas y/o subproductos de origen animal, cuya preservación de sus componentes radica en el uso de ácidos orgánicos y/o minerales que pueden ser agregados directamente o producirse por fermentación del mismo material. De manera específica se define el ensilado de vísceras de pollo como un producto semilíquido o pastoso que aprovecha los residuos de desechos de la industria avícola, pollo entero no apto para consumo humano o partes del mismo (cabeza, piel, patas y vísceras) que por efecto de las enzimas proteolíticas contenidos en el mismo y por adición directa de ácidos se logra una adecuada preservación.

El ensilado se puede clasificar en dos grupos:

a) *Ensilado químico*

El ensilado químico es elaborado mediante la adición de ácidos minerales y/o orgánicos. En un comienzo los ensayos favorecieron el uso de ácidos minerales como ácido clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, pero estos, al ser usados solos, demostraron ser malos preservadores del ensilaje (**Disney et al.**, 1977). Posteriormente se demostró que al usar mezclas de ácidos minerales con ácidos orgánicos (p.ej. ácido fórmico, propiónico y cítrico) se podía obtener un mejor producto. La materia prima se tritura, se le agrega el o los ácidos y se mezclan completamente, para que las enzimas presentes en el mismo puedan digerirlo en las condiciones favorables que el medio ácido provee. Se prefiere la utilización de ácido fórmico ya que asegura la conservación sin descenso excesivo en el pH (**Tatterson y Windsor**, 1973; **Windsor y Barlow**, 1984; **Córdova y Bello**, 1986; **Barral et al**, 1989). Una de las ventajas que representa el uso de ácidos orgánicos es que no requiere de neutralización antes de ser empleados en las dietas para la alimentación de animales. (**Pérez**, 1995).

b) *Ensilado biológico*

En el ensilado biológico se le agrega a la materia prima triturada una fuente de carbono y/o un microorganismo, capaz de utilizar el sustrato y producir ácido láctico. Se han estudiado diferentes fuentes de carbono tales como harinas de maíz, harina de avena, cebada malteada, arroz, yuca, azúcar, melaza, etc. y distintos organismos productores de ácido láctico (**Bello et al**, 1992; **Bertullo**, 1994, **Areche et al**, 1992; **Lessi et al**, 1992).

La mayoría de las investigaciones sobre ensilajes de productos animales percederos, han empleado el proceso de fermentación del material ensilado, y aunque algunos investigadores han logrado obtener una buena fermentación empleando una mezcla de alimentos ricos en carbohidratos fermentables junto con un sustrato proteínico no fermentable (**Raa y Gildberg**, 1982), la mayoría ha inoculado con bacterias lácticas para estimular la fermentación. Algunos de los cultivos mas exitosos han sido *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus faecium* y *Pediococcus acidilactici* (**Deshmukh y Patterson**, 1997).

Actualmente existen varias técnicas para la obtención del ensilado, ya sea por medios químicos o biológicos. Las operaciones comunes son: molienda,

homogeneización, envasado y almacenamiento. Algunas veces es necesaria una etapa previa, que incluye el lavado y la eliminación de materiales no deseados que pueden acompañar a la materia prima (**Bello et al**, 1992). En la bibliografía se pueden encontrar diferentes alternativas tecnológicas para la producción de ensilados. La elaboración de un ensilado biológico o químico puede llevarse a cabo tanto a nivel artesanal (barriles de 50 kg) como en escala industrial (una tonelada por día o más) (**Poulter y Disney**, 1982). No se han encontrado límites técnicos en el tamaño de la planta. Además, la tecnología de producción se puede adaptar fácilmente. El proceso puede ser manual, discontinuo o totalmente automatizado

2.3 Química del proceso de ensilaje

De acuerdo con los estudios realizados durante el proceso de ensilaje, se ha visto que dicho proceso se puede dividir en dos fases distintas, que se complementan. Una correspondiente a la hidrólisis o licuefacción, la cual está gobernada por las enzimas proteolíticas, y la otra correspondiente a la acidificación y reducción del pH que favorece la actividad proteolítica de las enzimas contenidas en el ensilado. La acidificación y reducción del pH está gobernado por la acción de los microorganismos ácido-lácticos, en el caso de un ensilado biológico (**Bello**, 1995), mientras que en el caso de un ensilado químico esto se lleva a cabo mediante la adición gradual de el o los ácidos correspondientes.

Bello y cols, (1993) estudiaron el proceso de elaboración del ensilado y su comportamiento durante el almacenamiento a temperatura ambiente durante 150 días, a través de índices físico-químicos y microbiológicos y se observa que durante los primeros cinco días hay una disminución drástica del pH, de valores de 6 hasta aproximadamente 4. Este valor se mantiene estable durante todo el período de almacenamiento. El pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento del ensilado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier cambio que pueda afectar el producto. En ensilados biológicos, paralelamente a la disminución del pH se observa el incremento rápido en los valores de ácido láctico, el cual se sigue produciendo lentamente por 60 días aproximadamente, hasta mantenerse estable. Posiblemente esto se debe a un mecanismo de auto control, estando en disponibilidad de continuar produciéndose ácido

cuando el pH aumente por incremento de compuestos nitrogenados, producto del crecimiento o desarrollo de organismos distintos a los ácido-lácticos.

En cuanto a la otra fase, el fenómeno de hidrólisis o licuefacción del ensilado, puede medirse o evaluarse a través del nitrógeno no-proteínico, el líquido exudado o la consistencia. Estas determinaciones muestran un aumento de la hidrólisis proteínica progresiva y rápidamente al inicio del proceso, haciéndose más lenta posteriormente hasta los 60 días. Aunque ambos fenómenos parecieran estar separados o ser independientes, presentan una relación estrecha. A medida que la hidrólisis proteínica progresa, se producen compuestos nitrogenados, como péptidos, aminoácidos, aminor y otros compuestos de bajo peso molecular. (Lindgren y Pleaje, 1983).

Durante el proceso de ensilaje, también ocurren cambios oxidativos en el contenido de lípidos. La principal alteración de la grasa es la oxidación de sus ácidos grasos insaturados, riesgo que aumenta a mayor número de dobles enlaces. Es por ello, que varios antioxidantes han sido usados para disminuir o prevenir el deterioro de la fracción lipídica en los ensilados (Machin et al, 1990; Espe et al., 1992 a, b.). Entre los más usados están el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y etoxiquin. El uso de estos antioxidantes ha dado buenos resultados al tratar de prevenir el grado de oxidación de las grasas (Carpenter y cols, 1963).

2.4 Implicaciones sanitarias de los ensilados.

La preocupación que genera el hecho de alimentar a los animales con productos que puedan contener agentes patógenos es muy importante, puesto que muchas de las fuentes usadas como materia prima para el ensilaje pueden estar contaminadas. Sin embargo, se ha demostrado que el proceso de adición de ácidos o fermentación ácida del ensilaje, es un medio efectivo para reducir o eliminar organismos patógenos, siempre y cuando esté bien realizado el proceso (Machin, 1986). Se ha visto que todas las bacterias que comúnmente causan infecciones alimentarias son inhibidas a pH menor a 4, y que en el caso de *Clostridium botulinum*, la posibilidad de intoxicación es prevenida con un pH menor a 4.5 (Frazier y Westhoff, 1978). La fermentación de estos desechos no aptos para consumo directo, también reduce el número de patógenos gram negativos (Talkington et al., 1981).

2.5 Uso de ensilados en la alimentación animal

Tradicionalmente, la mayoría de los desechos son cocidos antes de ser empleados en la alimentación animal y en algunos casos si no son usados inmediatamente, son deshidratados para facilitar su almacenaje y transporte. Este tipo de procesamiento se efectúa, cuando se dispone de grandes cantidades y el valor del producto final es de mediano a alto.

La técnica de ensilaje ha permitido procesar exitosamente la mayoría de los desechos de origen animal y de usarlos sin problemas como alimentos para animales. Existen trabajos de preservación de materias proteínicas usando medio ácido desde 1920 en Finlandia. Actualmente, se produce ensilado en países como Dinamarca, Finlandia, Polonia y algunos países de América Latina para alimentar a cerdos, aves, animales de peletería y en acuicultura (**Poulter y Disney**, 1982; **Jørgensen y Szymeczko**, 1992; **Bertullo**, 1989). **Pérez** (1995) observó que los ensilajes de pescado constituían un alimento apropiado para cerdos, gallinas, patos y rumiantes. Otros investigadores han empleado con éxito el ensilaje de pescado en acuicultura.

El ensilaje de pescado, es uno de los procesos mas estudiados. Históricamente, los alimentos para animales han estado formulados considerando a las harinas de pescado. Sin embargo, existen razones económicas y operativas que han incentivado la producción del ensilado de pescado en muchos países. Varios trabajos han tratado las ventajas y desventajas económicas de ambas alternativas (**Tatterson and Windsor**, 1973; **Windsor y Barlow**, 1984). Asimismo, desde el punto de vista nutricional, debe considerarse que durante el proceso de elaboración de la harina de pescado se llega a elevadas temperaturas (120-150 °C) lo que tiene un efecto perjudicial sobre la calidad de la misma, ya que el calor produce una importante disminución del valor biológico de las proteínas (**FAO**, 1971; **Avdalov et al**, 1992; **Villela et al**, 1992). Es por ello que la utilización de ensilado de pescado en la alimentación animal resulta más favorable que la harina del pescado.

En Venezuela, se han realizado estudios con ensilados de pescado en alimentación de cerdos (**Ottati y Bello**, 1990 a, b) y pollos (**Guevara et al**, 1991). En el caso de los cerdos, se realizaron los estudios en las etapas de crecimiento y engorda. Se emplearon cuatro dietas: control (sin pescado), alimento comercial y dos niveles de ensilado (2.5 y 5 %). Los resultados de este estudio indican que en los cerdos en etapa de

crecimiento, la mejor respuesta biológica se obtiene con la dieta que incluye un 5% de ensilado de pescado, mientras que en los cerdos en la etapa de engorda, la mejor respuesta fue con la dieta comercial y control. En cuanto a los estudios realizados en pollos de engorda por **Guevara et al** (1991), se emplearon cuatro dietas: control, harina de pescado 5% y dietas con 2.5 y 5 % de ensilado de pescado. Los resultados obtenidos indicaron que no existe diferencia significativa entre los incrementos de peso desarrollado por las aves alimentadas con los diferentes tratamientos, sin embargo se observó que el mejor índice de conversión lo presentó la dieta con 5 % de ensilado de pescado.

En muchos países del mundo ha sido usual alimentar a los rumiantes con forrajes ensilados, pero pocas veces se les ha usado en raciones comerciales de animales monogástricos, como los cerdos. **Lee y Close** (1987) estudiaron la posibilidad de incluir ensilajes, en raciones de cerdas preñadas con el propósito de mejorar su comportamiento reproductivo al mejorar el bienestar del animal. El objetivo principal era saciar el apetito del animal sin permitirle que engordara en exceso, puesto que dicha condición se asocia a problemas reproductivos. Para ello las cerdas se alimentaron con una ración de baja densidad nutritiva que permitió saciar apetito y mantener un peso adecuado, con lo que se logró un mejor comportamiento reproductivo y se redujo el costo de alimentación.

Se han encontrado resultados similares en ensayos con cerdos en crecimiento. El tracto digestivo de los cerdos de razas comerciales (p. ej. Large White, Landrace) permite el uso de ensilaje a partir de un peso vivo de 50 kg. No obstante, al usar este tipo de alimentación, la tasa de crecimiento del cerdo es menor que cuando recibe la ración tradicional de concentrado. El sistema de alimentación que incluye el ensilaje puede resultar interesante cuando el precio del concentrado es muy caro, y especialmente cuando este sistema permite reducir el costo de la mano de obra y de la estabulación.

El uso de forrajes ensilados pueden ser de gran beneficio para el pequeño productor para la alimentación de sus cerdas preñadas y sus cerdos en crecimiento o en engorda. Este sistema no se puede recomendar para cerdas lactantes por el alto requerimiento nutritivo que implica la producción de leche (**Machin**, 1990).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Elaborar un ensilado de tipo químico a partir de piel, cabezas, patas y vísceras de pollo, aprovechando las enzimas digestivas existentes en las mismas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Realizar un análisis proximal a la materia prima.
- Determinar la actividad enzimática de las enzimas proteolíticas presentes en la materia prima.
- Monitorear los cambios químicos que se producen durante el proceso de ensilaje. Tales como pH, oxidación lipídica y producción de nitrógeno no proteínico.
- Evaluar si existe diferencia significativa en el proceso de hidrólisis y acondicionamiento de pH al adicionar antioxidantes.
- Evaluar la efectividad de los antioxidantes empleados.
- Establecer las condiciones óptimas para el proceso de hidrólisis del ensilado.

4. METODOLOGÍA

4.1 Elaboración del ensilado a escala laboratorio

El presente estudio se llevó a cabo bajo el siguiente diagrama.

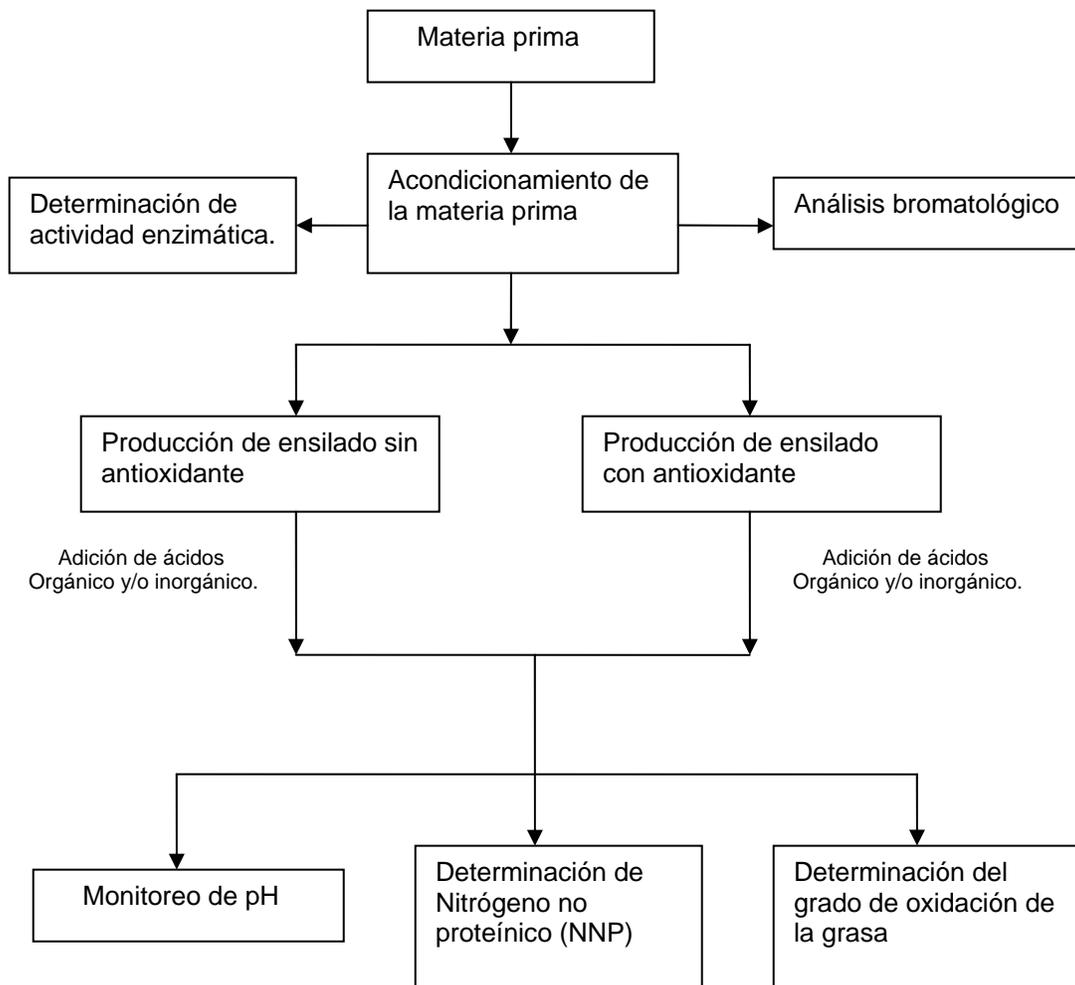


Figura 1. Diagrama de trabajo para la obtención del ensilado de vísceras de pollo a escala de laboratorio.

4.2 Materia prima

Como materia prima se utilizaron vísceras de pollo, piel, molleja, hígado, cabeza y patas que se adquirieron en una pollería dentro de un mercado de la ciudad de México. Toda la materia prima fue molida al día siguiente de ser adquirida, esto es para trabajar con la materia prima en las mejores condiciones.

4.2.1 Acondicionamiento de la materia prima

Como primer paso se realizó el acondicionamiento de la materia prima, el cual consistió en una selección y eliminación de la materia extraña acompañante. Posteriormente se realizó la molienda en una licuadora semi-industrial marca MOMAT L-10. Una vez obtenida una pasta homogénea, se procedió a separarla en 4 frascos de plástico con capacidad de 2kg y a cada uno de los frascos se le agregó 1Kg de dicha pasta. A dos de los frascos se les adicionó una mezcla de antioxidantes y a los otros dos no se les adicionó nada. Los frascos fueron almacenados en un horno a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se procedió a iniciar el estudio, que consistió en medir el pH del homogeneizado al mismo tiempo que se inicio la adición gradual de los ácidos y se monitoreo el descenso o aumento de pH, cantidad de nitrógeno no proteínico y grado de oxidación de las grasas.

4.3 Análisis bromatológico de la materia prima

De la pasta obtenida de la homogeneización de las vísceras de pollo, se tomó una fracción de 1000 g., a partir de la cual se realizó un análisis proximal de acuerdo con las técnicas establecidas por la AOAC (1990). Las determinaciones fueron: humedad, cenizas, proteína, grasa, fibra cruda e hidratos de carbono. Estos últimos obtenidos por diferencia de $100 - (\% \text{ humedad} + \% \text{ cenizas} + \% \text{ proteína} + \% \text{ grasa} + \% \text{ fibra cruda})$.

4.4 Actividad enzimática.

La actividad enzimática se determinó mediante el método de Anson (1938) empleando como sustrato una solución de hemoglobina. Una unidad de actividad proteolítica expresa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de $1 \mu\text{mol}$ de tirosina a 37°C al pH óptimo de la enzima en 1 minuto. Para el cálculo de la actividad específica (unidad de actividad/mg de proteína) se determinó la concentración de proteínas en los preparados enzimáticos según el método de Lowry (Bergmeyer, 1988).

4.4.1 Obtención del extracto enzimático

Reactivos:

- HCl 0.094 N.
Agregar 1.6 mL de ácido clorhídrico al 37 % en un matraz volumétrico de 200 mL, que previamente contenga aproximadamente 150 mL de agua destilada y posteriormente llevar al aforo con agua destilada. Mezclar perfectamente.
- Agua acidulada a pH = 3.0
En un vaso de precipitado de 250 mL agregar 100 mL de agua destilada e introducir el electrodo del potenciómetro dentro del vaso con agua, agregar poco a poco la solución de HCl 0.094 N, hasta llegar a un pH de 3.0.

Equipo:

- Balanza analítica Sartorius
- Homogeneizador potter
- Matraz volumétrico de 25 mL
- Vaso de precipitado de 100 mL y 250 mL
- Pipeta de 2 mL
- Espátula
- Centrifuga Surval Ultra
- Tubos para centrifuga
- Potenciómetro. Corning 1432.

Procedimiento:

- 1.- De la materia prima homogeneizada se tomó una fracción de aproximadamente 10 g. y se introdujo en un homogeneizador potter..
- 2.- El homogeneizador se colocó dentro de un baño de hielo y se procedió a realizar la fragmentación del tejido.
- 3.- Del homogeneizado se tomó una muestra de 2.5g, y se llevó a un pH de 3.0 con HCl 0.094N, con la finalidad de activar el pepsinógeno. (**Baez**, 1980).
- 4.-La muestra se llevó a un volumen de 25 mL en matraz aforado con agua acidulada a pH 3.0.
- 5.- El contenido del matraz volumétrico se vertió en un tubo para centrifuga.

6.- Se centrifugó a 16 000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

7.- Se separó el sobrenadante de la fracción sedimentada y se determinó el contenido de proteína y actividad enzimática en el sobrenadante (ver diagrama en anexo A)

A continuación se hará una descripción de las metodologías que se llevaron a cabo para la determinación de la actividad enzimática y proteína.

4.4.1.1 Determinación de actividad enzimática.

(µmoles de tirosina liberados en el extracto enzimático)

Reactivos:

- Solución Buffer fosfato-citrato pH=3.0
Disolver 1.67 g de ácido cítrico y 1.46 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ en 200 mL de agua destilada. Ajustar a pH = 3.0 con ayuda del potenciómetro.
- Solución de hemoglobina bovina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO USA) al 2% en HCl 0.06N
Pesar 1 g. de Hemoglobina bovina y disolverla poco a poco en 30 mL de HCl 0.06N. Una vez completamente disuelta llevar al aforo con la misma solución de HCl 0.06N en un matraz volumétrico de 50 mL. Esta solución se debe preparar el mismo día que se va a usar
- Ácido tricloroacético al 5 %
Pesar 25 g. de ácido tricloroacético y disolver en aproximadamente 400 mL de agua destilada. Una vez disuelto llevar al volumen de aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 500 mL.
- NaOH 0.498 N
Disolver 3.98 g. de lentejas de NaOH en 150 mL de agua destilada. Una vez disuelto, llevar al volumen de aforo con agua destilada en un matraz volumétrico de 200 mL.

- Reactivo de Folin diluido 1:2
Diluir 1 volumen del reactivo comercial de Folin-Ciocalteu con 2 volúmenes de agua destilada. Preparar al momento de su uso.
- Solución estándar de tirosina [$1\mu\text{mol}/5\text{mL}$]
Pesar 0.0181 g. de tirosina (Sigma Chemical Co.), disolver en aproximadamente 200 mL de agua destilada y llevar al volumen de aforo en un matraz volumétrico de 500 mL.

Equipos:

- Balanza analítica Sartorius
- Matraz volumétrico de 50 mL, 200 mL y 500 mL
- Vaso de precipitado de 50 mL y 250 mL
- Pipeta de 5 mL y 10mL
- Tubos de ensayo de 16 x150 mm.
- Papel Whatman No. 542
- Embudos
- Baño de agua, con regulación de temperatura.
- Vortex. Super mixer.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner. Modelo 340.

Procedimiento:

- 1.- Se tomó 1 mL del sobrenadante y se adicionó 4 mL de la solución de buffer fosfato-citrato pH=3.0 y se mezcló perfectamente (1er dilución).
- 2.- De la solución preparada en el paso anterior, se tomó 1 mL y se transfirió a un tubo de ensayo al cual se le agregó 4 mL de la solución de hemoglobina al 2 % (Sigma Chemical Co, St Louis, MO USA).
- 3.- Se incubó en un baño de agua a 37⁰C durante exactamente 10 minutos.
- 4.-Una vez transcurrido el tiempo, la reacción se detuvo agregando 10 mL de ácido tricloroacético al 5% (2da. dilución).
- 5.- El tubo se agito con ayuda de un vortex y la suspensión se filtró a través de papel filtro Whatman no. 542.

- 6.- Se tomó 2.5 mL del filtrado y se transfirió a otro tubo de ensayo. Se llevó a un volumen final de 5 mL adicionando 2.5 mL de agua destilada (3er dilución).
- 7.- Se agregó 10 mL de NaOH 0.498 N y 3 mL de reactivo de Folin diluido 1:2.
- 8.- Después de 10 min se procedió a leer la absorbancia de la muestra problema en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm. El espectrofotómetro se ajustó con el blanco de reactivos de la curva patrón de Tirosina.
- 9.- Para determinar el contenido de Tirosina en la muestra problema, se interpoló la lectura de absorbancia en la curva patrón de tirosina (ver diagrama en anexo A).

Preparación de la curva patrón de Tirosina

- 1.- Se prepararon 6 tubos de ensayo.
- 2.- Se agregó 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4mL y 5 mL de la solución estándar de tirosina en cada uno de los 6 tubos.
- 3.- Se llevó a un volumen total de 5 mL, agregando a cada tubo 5 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL, 1 mL y 0 mL de agua destilada respectivamente.
- 4.- Se adicionó a cada uno de los tubos 10 mL de NaOH 0.498N y 3 mL de reactivo de Folin diluido 1:2.
- 5.- Se mantuvieron en reposo durante 10 min y posteriormente se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 750 nm.
- 6.- Se trazó la curva patrón de Tirosina, graficando Abs a 750 nm vs μmol Tirosina/5mL.

Cálculos:

Para conocer la concentración de μmoles de tirosina liberados en el ensayo, se interpoló la lectura de absorbancia de la muestra en la ecuación de la curva de tirosina

$$\text{Abs}_{750\text{nm}} = m (\mu\text{mol tirosina} / 5\text{mL}) + b$$

$$\mu\text{mol tirosina} / 5 \text{ mL} = (\text{Abs}_{750\text{nm}} - b) / m$$

Donde:

Abs = Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 750 nm

b = ordenada al origen

m = pendiente

Para conocer la cantidad de μ moles liberados por 1 gramo de muestra, se usó la siguiente formula:

$$\mu\text{mol Tirosina/ g} = [(\mu\text{mol tirosina}/5\text{mL})(\text{aforo})(1\text{er dilución})(2\text{da dilucion})(3\text{er dilución})]/\text{Pm.}$$

Donde:

$\mu\text{mol tirosina}/5\text{mL}$ = Obtenido de la interpolación en la curva de tirosina

Aforo = 25 mL

1er dilución = 1mL \rightarrow 5mL

2da dilución =1mL \rightarrow 15 mL

3er dilución = 2.5mL \rightarrow 5 mL

Pm = peso de la muestra en gramos

4.4.1.2. Determinación de la proteína en el extracto enzimático

Reactivos:

- Solución estándar de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co. A-3425) [200 μ g/mL].
Disolver lentamente 10 mg de albúmina sérica bovina en agua destilada y llevar al volumen de aforo en matraz volumétrico de 50 mL. Almacenar esta solución en refrigeración.
- Ácido tricloroacético 3M
Disolver 122.6 g de ácido tricloroacético en agua destilada, llevar al volumen de aforo en un matraz volumétrico de 250 mL.
- NaOH 0.01N
Disolver 0.1 g de NaOH en agua destilada y llevar al volumen de aforo en un matraz volumétrico de 250 mL.
- NaOH 0.1N
Disolver 1.0 g de NaOH en agua destilada y llevar al volumen de aforo en un matraz volumétrico de 250 mL.

- Solución 1
Disolver 2 g de Na_2CO_3 anhidro y 20 mg de $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de NaOH 0.1 N.
- Solución 2
Disolver 50 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de agua destilada.
- Solución A
Mezclar 1 mL de la solución 2 con 50 mL de la solución 1.
- Solución B
Mezclar 5 volúmenes del reactivo comercial de Folin-Ciocalteu con 9 volúmenes de agua destilada. Preparar al momento de su uso.

Equipo:

- Balanza analítica Sartorius
- Vasos de precipitado de 50 mL, 100 mL y 250 mL
- Matraz volumétrico de 50 mL, 100 mL y 250 mL
- Pipeta de 5 mL y 10 mL
- Pipetas automáticas (200 – 1000 μL y de 1- 5 mL)
- Tubos de ensayo de 16 x 150 mm
- Vortex. Super mixer
- Espectrofotómetro Sequoia Turner. Modelo 340.
- Centrifuga

Procedimiento:

- 1.- Se transfirió 300 μL del sobrenadante a un tubo de ensayo y se llevó a un volumen total de 1 mL, agregando 700 μL de agua destilada.
- 2.- Se agregó 1 mL de agua destilada.y 1 mL de ácido tricloroacético 3 M.
- 3.- Se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm.
- 4.- Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 1 mL de NaOH 0.01N.
- 5.- Se agregó 5 mL de la solución A.

- 6.- Se mezcló con ayuda de un vortex y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- 7.- Transcurridos los 10 minutos se agregó 0.5 mL de la solución B.
- 8.- Se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 9.- Se determinó la absorbancia de la muestra problema en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 578 nm. El espectrofotómetro se ajustó con un blanco de reactivos de la curva patrón de albúmina.
- 10.- Se determinó el contenido de proteína en la muestra problema, interpolando en la curva patrón de albúmina (ver diagrama en anexo A).

Preparación de la curva patrón de Albúmina

- 1.- Se prepararon 6 tubos de ensayo.
- 2.- Se agregó 0 μL , 200 μL , 400 μL , 600 μL , 800 μL y 1000 μL de la solución estándar de albúmina en cada uno de los 6 tubos.
- 3.- Se llevó a un volumen total de 1000 μL , agregando a cada tubo 1000 μL , 800 μL , 600 μL , 400 μL , 200 μL y 0 μL de agua destilada respectivamente.
- 4.- Se adicionó a cada uno de los tubos 5 mL de la solución A.
- 5.- Cada tubo se mezcló con ayuda de un vortex y se dejó a temperatura ambiente 10 minutos.
- 6.- Transcurridos los 10 minutos se agregó a cada tubo 0.5 mL de la solución B.
- 7.- Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 578 nm.
- 7.- Se trazó la curva patrón de Albúmina, graficando Abs a 578 nm vs μg de proteína/mL.

Cálculos:

Para conocer la concentración de μg de proteína en la alícuota, se interpoló la lectura de absorbancia de la muestra en la ecuación de la curva de albúmina.

$$\text{Abs}_{578\text{nm}} = m (\mu\text{g de proteína/mL}) + b$$

$$\mu\text{g de proteína/mL} = (\text{Abs} - b)/m$$

Donde:

Abs = Absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 578 nm.

b = ordenada al origen.

m = pendiente

Para conocer la cantidad de mg de proteína en 1 gramo de muestra, se sustituyó en la siguiente formula:

$$\text{mg proteína/ g} = [(\mu\text{g proteína/mL})(\text{Aforo})(\text{Dilución})] / [(Pm)(1000)]$$

Donde:

$\mu\text{g proteína/mL}$ = Obtenido de interpolar en la curva de proteína.

Aforo = 25 mL

Dilución = 0.3mL \rightarrow 1 mL

Pm = Peso de la muestra en gramos.

4.5 Proceso de ensilaje

El proceso de ensilaje consistió en monitorear los cambios químicos y físicos de un ensilado con adición de antioxidantes y un ensilado sin adición de antioxidantes. El proceso se realizó por duplicado; a dos frascos se les agregó 130 ppm de una mezcla de antioxidantes en la misma proporción, preparados a partir de una mezcla 1:1:1 (Butilhidroxitolueno (BHT), terbutilhidroxiquinona (TBHQ) y ácido cítrico) y a los otros dos frascos no se les agregó nada. Todos los frascos fueron tratados bajo las mismas condiciones experimentales. Los frascos se incubaron en una incubadora a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con agitación manual durante el período de estudio de 60 días. En esta parte se aprovecha la presencia de las enzimas digestivas (proteolíticas y lipolíticas) contenidas en las vísceras de pollo, las cuales contribuirán al proceso de hidrólisis. Como primer paso, se midió el pH inicial en cada uno de los frascos y considerando que dichas enzimas presentan su mayor actividad cuando el pH se reduce a valores cercanos entre 3 y 4, se procedió con la adición sucesiva de 1 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de ácido propiónico en cada uno de los frascos hasta lograr disminuir rápidamente el pH a valores cercanos de 3.0-4.0. Para lograr esto, durante las primeras 5 horas de inicio del proceso de ensilaje, la adición de ácidos se realiza durante cada hora, tomándose lecturas de pH antes y después de la

adición de ácidos. El pH es monitoreado durante todo el proceso de ensilaje y la adición de ácidos se suspendió una vez que los valores de pH no mostraron incrementos, lograndose estabilizar el pH en valores cercanos entre 3 y 4.

4.6 Parámetros monitoreados durante el proceso de ensilaje

4.6.1 pH

Desde el inicio del estudio hasta el final, el pH fue determinado mediante el uso de un potenciómetro marca Corning 1432. La determinación de pH se realizó durante los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 11,15, 21, 31, 39, 46 y 61. Únicamente durante las primeras 5 horas del primer día de estudio el pH es monitoreado cada hora.

4.6.2 Avance en el proceso de hidrólisis del contenido proteínico.

Se siguió la técnica propuesta por **Lo y cols** (1993). Esta técnica permite conocer la evolución del proceso hidrolítico en el contenido proteínico y se expresa como el porcentaje de nitrógeno no proteínico (NNP) con respecto al contenido de nitrógeno total (NT) y se determinó aplicando la siguiente formula:

$$\% \text{Hidrólisis} = (\% \text{ NNP} \times 100) / \% \text{NT}$$

Su determinación se llevó a cabo durante los días: 1, 2, 3, 8, 18, 43 y 61.

4.6.2.1 Determinación de nitrógeno no proteínico (NNP)

Este es cuantificado a partir de la precipitación de las proteínas, mediante la adición de ácido tricloracético, en donde el nitrógeno no proteínico es separado del nitrógeno proteínico mediante filtración y el nitrógeno que pasa en el filtrado es cuantificado mediante el método Kjeldahl.

Reactivos:

- Ácido tricloroacético al 20%.

Pesar 200 g de ácido tricloroacético y disolverlo en 800 mL de agua destilada y verterlo en matraz volumétrico de 1000 mL, llevar al volumen de aforo con agua destilada.

- Mezcla digestiva.
Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada, agregar 50 mL de H_3PO_4 . Una vez que este completamente disuelta la sal, adicionar lentamente y resbalando por las paredes del recipiente 430 mL de H_2SO_4 concentrado. Mezclar perfectamente.
- Peróxido de hidrógeno al 30%
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40%.
- Solución indicadora A
Disolver 100 mg de verde de bromocresol con alcohol metílico en matraz aforado de 100 mL.
- Solución indicadora B
Disolver 100 mg de rojo de metilo con alcohol metílico en matraz aforado de 100 mL
- Solución de ácido bórico con indicadores
Pesar 10 g de ácido bórico y disolver en aproximadamente 800 mL. Transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 10 mL de la solución de indicador A y 7 mL de solución indicadora B. Mezclar, ajustar el color a un tono café rojizo adicionando ácido o álcali según se requiera y llevar al volumen de aforo con agua destilada.
- Solución de HCl 0.01N valorado hasta la cuarta cifra decimal.
- Glucosa (R. A.)

Equipo:

- Balanza analítica Sartorius
- Matraz kitazato 250 mL.
- Embudo buchner
- Matraz volumétrico de 20 mL
- Pipeta automática finnpipette de 1-5 mL
- Digestor TECATOR. Modelo Ab-20/40
- Equipo de microdestilación Kjetec Autoanalyzer TECATOR Modelo 1030.
- Tubos de digestión Tecator de 75 mL
- Papel Wathman No. 541.

Procedimiento:

- 1.- Se pesó 2,5 g. del ensilado con y sin antioxidante, se disolvió en solución de ácido tricloroacético al 20% y se llevó al aforo con la misma solución de ácido tricloroacético en un matraz volumétrico de 25 mL.
- 2.- Se dejó en reposo durante 1 hora.
- 3.- Transcurrido el tiempo se filtró al vacío a través de un papel Wathman No. 541 con ayuda de un embudo buchner y un matraz kitazato.
- 4.- Se tomó 2 mL del filtrado y se transfirió al tubo de digestión
- 5.- Se adicionó 0.5 g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva.
- 6.- Se colocaron los tubos de digestión en el digestor de proteína a 340°C y se mantuvieron a esa temperatura durante 15 minutos.
- 7.- Transcurridos los 15 minutos, se retiraron los tubos del digestor y se esperó a que la temperatura descendiera a temperatura ambiente.
- 8.- Se adicionó 1.5 mL de H₂O₂ al 30% a cada tubo y se colocaron nuevamente en el digestor de proteína a una temperatura de 370°C. Se mantuvieron en digestión hasta que los tubos adquirieron una coloración verde transparente (aproximadamente 1.5 horas).
- 9.-Una vez concluido el proceso de digestión, se retiraron los tubos del digestor y se esperó a que la temperatura descendiera a temperatura ambiente para continuar con el proceso de destilación. Para lo cual se disolvieron las proteínas digeridas agregando 20 mL de agua destilada.
- 10.- Se colocó uno a uno los tubos con la muestra digerida en el microdestilador automático, y se registraron los datos de HCl gastados en la titulación del amoniaco atrapado en la solución de ácido bórico con indicadores.
- 11.- De manera simultánea se realizó un blanco de reactivos, pesando 0.08 g de glucosa, la cual se digirió y destiló bajo las mismas condiciones que las muestras.

Cálculos:

$$\% \text{ NNP} = [(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

Donde:

% NNP = % de nitrógeno no proteínico.

P = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación de la muestra.

B = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de HCl.

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

m = peso de la muestra en gramos.

4.6.2.2 Determinación de nitrógeno total (NT)

La determinación de nitrógeno total se realizó mediante el método Kjeldahl. El cual consiste en la digestión de las proteínas en una mezcla con ácido sulfúrico en presencia de catalizadores. El nitrógeno orgánico total es convertido en sulfato de amonio. La mezcla digerida se neutraliza con una base y se destila posteriormente en una solución de ácido bórico. Los aniones del borato así formado se titulan con HCl estandarizado, lo cual se convierte en el nitrógeno de la muestra.

Reactivos:

- Mezcla digestiva.
Disolver 3 g de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 mL de agua destilada, agregar 50 mL de H_3PO_4 . Una vez que este completamente disuelta la sal, adicionar lentamente y resbalando por las paredes del recipiente 430 mL de H_2SO_4 concentrado. Mezclar perfectamente.
- Peróxido de hidrógeno al 30% (R.A.)
- Sulfato de potasio (R.A.)
- Solución de NaOH al 40%.
- Solución indicadora A
Disolver 100 mg de verde de bromocresol con alcohol etílico en matraz aforado de 100 mL.
- Solución indicadora B
Disolver 100 mg de rojo de metilo con alcohol etílico en matraz aforado de 100 mL.
- Solución de ácido bórico con indicadores
Pesar 10 g de ácido bórico y disolver en aproximadamente 800 mL. Transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL, agregar 10 mL de la solución de indicador A y 7 mL de solución indicadora B. Mezclar, ajustar el color a un tono café rojizo adicionando ácido o álcali según se requiera y llevar al volumen de aforo con agua destilada.

- Solución de HCl 0.01N valorado hasta la cuarta cifra decimal.
- Glucosa (R. A.)

Equipos:

- Balanza analítica Sartorius
- Digestor TECATOR. Modelo Ab-20/40.
- Equipo de microdestilación Kjetec Autoanalyzer TECATOR Modelo 1030.
- Tubos de digestión Tecator de 75 mL

Procedimiento:

- 1.- Se pesó 0.10 g de ensilado con y sin antioxidante
- 2.- Se adicionó 0.5 g de sulfato de sodio y 3 mL de mezcla digestiva.
- 3.- Se colocaron los tubos de digestión en el digestor de proteína a 340⁰C y se mantuvieron durante 15 minutos.
- 4.- Transcurridos los 15 minutos, se retiraron los tubos del digestor y se esperó a que la temperatura descendiera a temperatura ambiente.
- 5.- Se adicionó 1.5 mL de H₂O₂ al 30% y se colocaron nuevamente en el digestor de proteína a una temperatura de 370⁰C. Se mantuvieron en digestión hasta que los tubos adquirieron una coloración verde transparente (aproximadamente 1.5 horas).
- 6.- Una vez concluido el proceso de digestión, se retiraron los tubos del digestor y se esperó a que la temperatura descendiera a temperatura ambiente para continuar con el proceso de destilación. Para lo cual se disolvieron las proteínas digeridas agregando 20 mL de agua destilada.
- 7.- Se colocó uno a uno los tubos con la muestra digerida en el microdestilador automático, y se registraron los datos de HCl gastados en la titulación del amoníaco atrapado en la solución de ácido bórico con indicadores.
- 8.- De manera simultánea se realizó un blanco de reactivos, pesando 0.08 g de glucosa, la cual se digirió y destiló bajo las mismas condiciones que las muestras.

Cálculos:

$$\% \text{ NT} = [(P-B) \times N \times \text{meq} \times 100] / m$$

Donde:

% NT = % de nitrógeno total.

P = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación de la muestra.

B = mL de HCl 0.01N gastados en la titulación del blanco.

N = normalidad de la solución de HCl.

meq = miliequivalentes de nitrógeno (0.014).

m = peso de la muestra en gramos.

4.6.3 Determinación del grado de oxidación de la grasa

Para la determinación del grado de oxidación de la grasa en el ensilado, se utilizó la técnica propuesta por **Vyncke (1970)**. Dicha técnica consistió en medir las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico. Esta medición se llevó a cabo durante los días: 0, 2, 3, 8, 18, 43 y 61. De los aldehídos que resultan de la oxidación de los lípidos, el malonaldehído es el principal compuesto producido, este reacciona junto con los otros aldehídos y produce compuestos coloridos, que van de rosa pálido al rojo. Estos pueden ser detectados a una longitud de onda de 538 nm por espectrofotometría.

Reactivos:

- Ácido tricloroacético 7.5 %.
Pesar 7.5 g de ácido tricloroacético y disolver en agua destilada, llevar al volumen de aforo en matraz volumétrico de 100 mL.
- Solución de ácido tiobarbitúrico (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) 0.02 M.
Pesar 1.441 g de ácido tiobarbitúrico y disolver en aproximadamente 400 mL de agua destilada, verter en un matraz volumétrico de 500 mL y llevar al aforo con agua destilada.
- Solución estándar de tetraetoxipropano 9.8×10^{-3} M.
Pesar 1.98 g de tetraetoxipropano y disolver en 800 mL de agua destilada y transferir a un matraz volumétrico de 1000 mL y llevar al volumen de aforo.

- Solución de trabajo de tetraetoxipropano $9.8 \times 10^{-6}M$
Tomar 1 mL de la solución estándar de tetraetoxipropano $9.8 \times 10^{-3} M$ y vertir en un matraz volumétrico de 1000 mL, llevar al volumen de aforo con agua destilada.

Equipos:

- Balanza analítica Sartorius
- Matraz kitazato 250 mL.
- Embudo buchner
- Matraz volumétrico de 10 y 1000mL
- Pipeta automática finnpipette (de 200 – 1000 μL y de 1- 5 mL).
- Papel Wathman No. 541.
- Tubos de vidrio con tapadera.
- Espectrofotómetro Sequoia Turner. Modelo 340.

Procedimiento:

- 1.- Se pesó 2.5 de ensilado y se disolvió en aproximadamente 15 mL de solución de ácido tricloroacético al 7.5 %, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó al aforo con la misma solución de ácido tricloroacético 7.5 %.
- 2.- Se filtró al vacío a través de un papel Wathman No. 541 con ayuda de un embudo buchner y un matraz kitazato.
- 3.- Del filtrado se tomó una alícuota de 500 μL y se transfirió a un tubo de vidrio de capacidad de 20 mL con tapadera.
- 4.- Se llevó a un volumen final de 5 mL, agregando 4.5 mL de agua destilada.
- 5.- Se agregó 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.02 M.
- 6.- Se cerró perfectamente el tubo y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 45 minutos.
- 7.- Transcurridos los 45 minutos, se enfrió en baño de agua fría.
- 8.- Una vez que el contenido de los tubos descendió a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia en espectrofotómetro durante los primeros 30 minutos a una longitud de onda de 538 nm. Se ajustó el espectrofotómetro con el blanco de reactivos de la curva patrón de Tetraetoxipropano.
- 9.- Se determinó el contenido de tetraetoxipropano en la muestra problema, interpolando en la curva patrón de tetraetoxipropano.

Preparación de la curva de tetraetoxipropano

- 1.- se tomó 0 μL , 400 μL , 800 μL , 1200 μL , 1600 μL y 2000 μL de la solución de trabajo de tetraetoxipropano ($9.8 \times 10^{-6}\text{M}$) y se transfirió a un tubo de vidrio de capacidad de 20 mL con tapadera.
- 2.- Se llevó a un volumen final de 5 mL, agregando 5 mL, 4.6 mL, 4.2 mL, 3.8 mL, 3.4 mL y 3 mL de agua destilada en cada uno de los tubos correspondientes.
- 3.- Se agregó 5 mL de ácido tiobarbitúrico 0.02 M.
- 4.- Se taparon los tubos y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante 45 minutos.
- 5.- Transcurridos los 45 minutos, se enfriaron en baño de agua fría.
- 6.- Una vez que el contenido de los tubos descendió a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia en el espectrofotómetro durante los primeros 30 minutos a una longitud de onda de 538 nm.

Cálculos:

Para conocer la concentración de tetraetoxipropano (TEP) en la alícuota de la muestra, se interpoló la lectura de absorbancia de la muestra en la ecuación de la curva de tetraetoxipropano:

$$\text{Abs}_{538\text{nm}} = m [\text{TEP}] + b$$

$$[\text{TEP}] = (\text{Abs}_{538\text{nm}} - b)/m$$

Donde:

[TEP] = Concentración molar de tetraetoxipropano

$\text{Abs}_{538\text{nm}}$ = Absorbancia en la alícuota de la muestra a una longitud de onda de 538 nm.

b = ordenada al origen.

m = pendiente.

Para conocer la cantidad de malonaldehído presente en el ensilado, expresado en mg de malonaldehído/Kg, se aplicó la siguiente formula:

$$\text{mg malonaldehído/Kg} = (\text{Aforo/ Pm})(\text{A/B}) \times (\text{PM}) \times 1000 \text{ g} \times (1000 \text{ mg/ 1g})$$

Donde:

Aforo = 25 mL

Pm = peso de muestra en gramos

A = Concentración obtenida de la interpolación de la absorbancia en la curva de TEP

B = Alícuota tomada del filtrado en mL

PM = Peso molecular del malonaldehído (72 g/mol)

4.7 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se empleo el programa estadístico Minitab 14.12. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía con prueba de rango múltiple de Tukey, con una probabilidad $p < 0.05$.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Materia prima

El primer paso en la elaboración del ensilado, consistió en la homogeneización de la materia prima (vísceras de pollo, piel, patas, cabezas) de la cual se obtuvo una pasta, a la que se le determinó su contenido proximal. Los resultados se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis proximal de la materia prima (g/100g de muestra) expresado en base húmeda y en base seca.

	Composición proximal En base húmeda	Composición proximal en base seca
Humedad	70.43 ± 0.22	--
Proteína	11.04 ± 0.64	37.33 ± 0.22
Grasa	13.49 ± 0.11	45.63 ± 0.40
Cenizas	3.99 ± 0.17	13.50 ± 0.06
Fibra cruda	0.77 ± 0.03	2.60 ± 0.01
Carbohidratos	0.28*	0.94*

Los valores fueron obtenidos por triplicado ± D.S. Con un CV < 2%

* Obtenidos por diferencia.

Como se puede observar en el cuadro 1, la materia prima está constituida por una cantidad importante de proteína, grasa y cenizas y una pequeña cantidad de fibra. Cabe señalar que de acuerdo con los datos de análisis proximal reportados en la literatura, las vísceras de pollo no contienen fibra (**S.A.R.H**, 1980). Sin embargo en este caso se reporta dicha cantidad de fibra, debido a que las vísceras fueron molidas con el contenido de los residuos de alimento ingerido por el pollo antes de la matanza. En cuanto al contenido de proteína este es relativamente bajo, considerando otros ensilados elaborados a partir de desechos de origen animal en los cuales la cantidad de proteína es mayor, por ejemplo en el ensilado de pescado sierra los valores fluctúan alrededor de 18 % en base húmeda (**Santana**, 2004), en el caso de ensilado elaborado a partir de desechos de sardina, el contenido de proteína se encuentra alrededor de 14 % (**González D**, 2005). Sin embargo, autores como Gutierrez y cols (**2003**) consideran que las materias primas a ensilar deben tener como mínimo un 7 % de proteína para ser adecuado para dicho proceso.

5.2 Actividad enzimática.

La actividad enzimática específica expresada como unidad de actividad/mg de proteína, se muestra en el siguiente cuadro.

Cuadro 2. Determinación de actividad enzimática específica en el homogeneizado de vísceras de pollo.

	Actividad enzimática específica (μmol tirosina $\text{min}^{-1}/\text{mg}$ proteína)
Homogeneizado de vísceras de pollo.	3.96
	3.98
	4.00
Promedio \pm D.S.	3.98 \pm 0.02

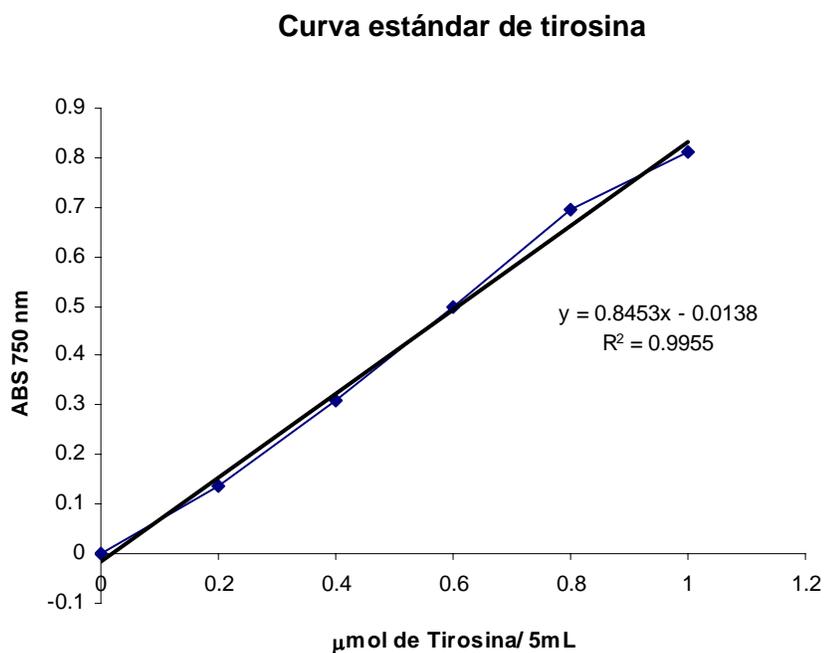
Los valores fueron obtenidos por triplicado \pm D.S. Con un CV menor 0.5 %

Los resultados obtenidos muestran que las unidades de la actividad enzimática específica obtenida en la materia prima es adecuada para llevar a cabo el proceso de hidrólisis en el ensilado, lo cual se explica por la gran cantidad de pepsinógenos (precursores de pepsina) presentes en la mucosa gástrica de los pollos y por la presencia de las pepsinas en el contenido de la molleja y en el proventrículo de los pollos. **Donta y cols** (1970) encontraron que en el proventrículo de pollos recién sacrificados hay una gran cantidad de pepsinógenos y pepsinas. Ellos realizaron un estudio de aislamiento de pepsinas y pepsinógenos a partir de los proventrículos de los pollos y determinaron la actividad proteolítica usando como sustrato hemoglobina (**Anson**, 1938). Como resultado obtuvieron que la mayoría de las pepsinas aisladas presentaron unidades de actividad enzimática específica en valores que oscilan entre 2 y 12 unidades. Si consideramos que en la materia prima aquí estudiada se obtuvo 3.98 unidades de actividad enzimática específica. Se puede decir que presenta una actividad enzimática relativamente alta, ya que no se trata de enzimas de pepsinas purificadas como en el caso reportado por **Donta y cols** (1970) y en este caso las unidades de actividad enzimática específica aquí reportada, se debe al conjunto de enzimas contenidas en la materia prima.

Para el cálculo de la *unidad de actividad enzimática específica* se determinó como primer paso la *unidad de actividad enzimática* la cual expresa la cantidad de enzima necesaria para catalizar la liberación de 1 μmol de tirosina en un minuto y de manera simultánea se determinó la cantidad de proteína presente en el homogeneizado de vísceras de pollo, para finalmente determinar las *unidades de actividad enzimática específica* que se define como una unidad de actividad por cada mg de proteína. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

5.2.1 Determinación de μmoles de tirosina liberados en el extracto enzimático

Para conocer la cantidad de μmoles de tirosina liberados en la alícuota tomada para el ensayo, se interpoló la absorbancia obtenida en la curva patrón de tirosina (ver cálculos en anexo B).



Curva 1. Curva estándar para la determinación de μmoles de tirosina liberados en el extracto enzimático

Tabla A. Valores de μmol de tirosina vs Abs de la curva estándar de tirosina

μmol tirosina/5mL	Abs a 750nm
0.00	0.000
0.20	0.138
0.40	0.310
0.60	0.498
0.80	0.696
1.00	0.811

En el siguiente cuadro se muestra la cantidad de μmoles de tirosina liberados en la alícuota tomada para llevar a cabo el ensayo. Así como los μmoles de tirosina liberados por un gramo de muestra en un minuto.

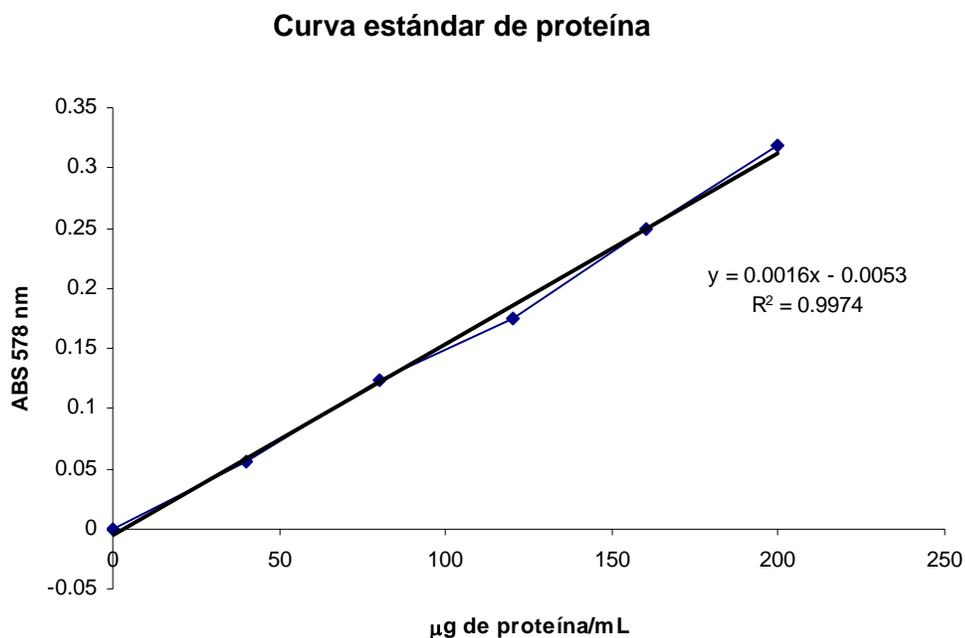
Cuadro 3. μmoles de tirosina liberados en 1 g. de homogenizado (vísceras de pollo)

Alícuota tomada para llevar a cabo el ensayo (mL)	Abs a 750nm	μmoles de tirosina/5mL	μmol de tirosina liberados en 1 g de homogenizado*	Unidad de actividad (μmol tirosina/min)
2.5	0.690	0.83	248.90	24.89
2.5	0.699	0.84	251.89	25.19
2.5	0.714	0.86	257.90	25.79
Promedio \pm D.S.	0.701 ± 0.01	0.84 ± 0.01	252.90 ± 4.58	25.29 ± 0.46

* μmoles de tirosina liberados en 1 g. de homogenizado en 10 minutos.
Los resultados fueron obtenidos por triplicado con un C.V. menor a 2.0 %.

5.2.2 Determinación de la proteína en el extracto enzimático

Para conocer la cantidad de proteína contenida en la alícuota tomada para el ensayo, se interpoló la absorbancia obtenida en la curva patrón de albúmina (ver cálculos en anexo B)



Curva 2. Curva estándar para la determinación de proteína en el extracto enzimático mediante el método de Lowry.

Tabla B. Valores de µg de proteína/mL vs Abs de la curva estándar de proteína

µg de proteína/mL	Abs a 578nm
0.00	0.000
40.0	0.055
80.0	0.124
120.0	0.175
160.0	0.249
200.0	0.318

En el siguiente cuadro se muestra la cantidad de proteína obtenida en la alícuota tomada para el ensayo y la cantidad de proteína contenida en 1 g. de homogeneizado (ver cálculos en anexo B).

Cuadro 4. Cantidad de mg de proteína contenidos en 1 g. de homogeneizado

Alícuota tomada del extracto enzimático (mL)	ABS a 750nm	µg de proteína/mL	mg de proteína/g de homogeneizado
0.3	0.297	188.94	6.29
0.3	0.298	189.56	6.32
0.3	0.304	193.31	6.44
Promedio ± D.S.	0.300 ± 0.004	190.60 ± 2.36	6.35 ± 0.08

Los resultados fueron obtenidos por triplicado con un C.V. menor a 1.5%

5.3 Parámetros monitoreados durante el proceso de ensilaje.

5.3.1 pH

El comportamiento de pH en ambos casos fue muy semejante (ver cuadro 5) y no se observó diferencia significativa de acuerdo con el análisis estadístico. (ver anexo C).

Cuadro 5. Acondicionamiento y monitoreo de pH durante el proceso de ensilaje.

Tiempo	ENSILADO SIN ANTIOXIDANTE			ENSILADO CON ANTIOXIDANTE		
	pH _i	Volumen adicionado de ácido (mL)	pH _f	pH _i	Volumen adicionado de ácido (mL)	pH _f
Día 1: 0 horas	5.76	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	5.29	5.76	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	5.48
1 hora	5.1	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	4.31	5.20	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	4.25
2 horas	4.25	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	4.06	4.18	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.90
3 horas	4.29	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.73	4.10	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.68
4 horas	3.92	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.50	3.69	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.29
5 horas	3.69	2 mL H ₂ SO ₄ + 2 mL ac. Propionico	3.01	3.40	2 mL H ₂ SO ₄ + 2 mL ac. Propionico	2.99
Día 2	3.23	0 mL	3.23	3.20	0 mL	3.20
Día 3	4.09	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.73	3.87	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.41
Día 4	4.48	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.80	4.00	1 mL H ₂ SO ₄ + 1 mL ac. Propionico	3.38
Día 5	3.98	0 mL	3.98	3.91	0 mL	3.91
Día 7	3.79	0 mL	3.79	3.69	0 mL	3.69
Día 11	3.82	0 mL	3.82	3.76	0 mL	3.76
Día 15	3.97	2.5 mL H ₂ SO ₄ mL	3.59	3.89	2.5 mL H ₂ SO ₄	3.60
Día 21	3.71	0 mL	3.71	3.65	0 mL	3.65
Día 31	3.4	0 mL	3.4	3.64	0 mL	3.64
Día 39	3.3	0 mL	3.3	3.66	0 mL	3.66
Día 46	3.53	0 mL	3.53	3.52	0 mL	3.52
Día 61	3.50	0 mL	3.50	3.60	0 mL	3.60

pH_i : Lectura de pH antes de agregar ácido.
 pH_f : Lectura de pH después de agregar ácido.

El día que se inició el experimento (día 1) la adición de ácido sulfúrico y ácido propiónico, fue constante durante las primeras 5 horas, ya que se adicionó 1mL de ácido propiónico y 1mL de ácido sulfúrico concentrado. Esto con la finalidad de disminuir el pH en el menor tiempo posible. De esta manera se logró llegar a un pH cercano a 3.0 durante el inicio del estudio. El día 2 no se adicionó ácidos dado, que las lecturas de pH fue menor a 4.0.. Durante los días 3 y 4 si se adicionó ácido sulfúrico y propiónico, ya que las lecturas de pH mostraban ir en aumento. De esta manera, se continuó con el monitoreo de pH durante los días 5, 7 y 11. La última adición de ácidos fue hasta el día 15, dado que se observó un ligero aumento en el pH. Durante los días siguientes, ya no hubo adición de ácidos, pues el pH permaneció constante. Lográndose obtener un ensilado con un pH alrededor de 3.5-3.6.

Como se puede ver en el cuadro 5, el pH se logra estabilizar a partir del día 15, tanto en el ensilado con antioxidantes y sin antioxidantes. Lo que significa que se podría dar por concluida la elaboración del ensilado a partir de este día.

5.3.2 Avance en el proceso de hidrólisis del contenido proteínico

La determinación del nitrógeno no proteínico permitió conocer el grado de hidrólisis durante el proceso de ensilaje, para ello fue necesario compararlo con el contenido de nitrógeno total presente en la mezcla. En el cuadro 6, se muestra el contenido de nitrógeno total y contenido de nitrógeno no proteínico en la pasta obtenida después de homogeneizar las vísceras al inicio del experimento.

Cuadro 6. Contenido porcentual de nitrógeno total y nitrógeno no proteínico en el homogeneizado de vísceras de pollo.

Muestra	% Nitrógeno total (NT)	% Nitrógeno no proteínico (NNP)
Homogeneizado de vísceras de pollo	1.77 ± 0.02	0.48 ± 0.003

Los valores fueron obtenidos por triplicado ± D.S. Con un CV menor a 1.0 %

Para poder evaluar el proceso de hidrólisis se realizó la determinación de nitrógeno no proteínico durante los días 1, 2, 3, 8, 18, 43 y 61 (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Desarrollo del proceso hidrolítico (%NNP con respecto al %NT)

Tiempo	Ensilado sin antioxidantes			Ensilado con antioxidantes		
	%NT	%NNP	% Hidrólisis	%NT	%NNP	% Hidrólisis
0 horas	1.77 ± 0.01	0.48 ± 0.03	27.12 ± 0.17	1.76 ± 0.01	0.48 ± 0.01	27.27 ± 0.17
2 horas	1.77 ± 0.01	0.63 ± 0.02	35.59 ± 0.95	1.76 ± 0.01	0.64 ± 0.01	36.36 ± 0.42
4 horas	1.77 ± 0.01	0.80 ± 0.02	45.20 ± 0.97	1.76 ± 0.01	0.84 ± 0.01	47.73 ± 0.46
6 horas	1.77 ± 0.01	0.91 ± 0.02	51.41 ± 1.05	1.76 ± 0.01	0.89 ± 0.01	50.57 ± 0.41
Día 2	1.73 ± 0.04	1.17 ± 0.01	67.63 ± 0.68	1.75 ± 0.04	1.14 ± 0.01	65.14 ± 0.37
Días 3	1.77 ± 0.03	1.28 ± 0.01	72.32 ± 0.15	1.77 ± 0.03	1.28 ± 0.02	72.32 ± 0.17
Día 8	1.74 ± 0.05	1.49 ± 0.02	85.63 ± 0.23	1.76 ± 0.05	1.52 ± 0.05	86.36 ± 1.15
Día 18	1.79 ± 0.04	1.71 ± 0.02	95.53 ± 0.92	1.75 ± 0.04	1.64 ± 0.04	93.71 ± 0.53
Día 43	1.78 ± 0.03	1.76 ± 0.02	98.88 ± 1.25	1.79 ± 0.02	1.76 ± 0.01	98.32 ± 0.47
Día 61	1.76 ± 0.01	1.73 ± 0.03	98.29 ± 0.20	1.76 ± 0.04	1.72 ± 0.01	97.73 ± 0.34

Los valores fueron obtenidos por triplicado ± D.S. Con un CV menor a 3.0 %

Como puede observarse en el cuadro 7, los valores de nitrógeno no proteínico muestran una buena eficiencia en el avance del proceso de hidrólisis con respecto a la materia prima. Los valores de degradación de la proteína, son expresados como el % de nitrógeno no proteínico con respecto al % de nitrógeno total en el ensilado, dichos valores se ven representados en la Figura 1.

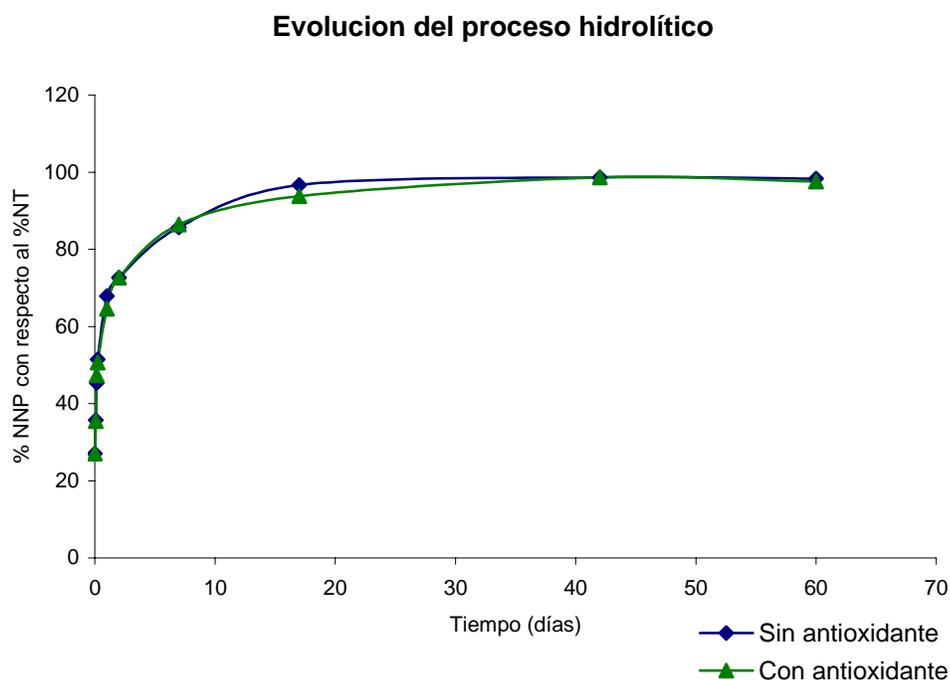


Figura 1. Evaluación del proceso hidrolítico durante el proceso de ensilaje, expresado como % de nitrógeno no proteínico con respecto al % de nitrógeno total.

La velocidad de proteólisis es más alta durante los primeros dos días del proceso de ensilaje. El mayor porcentaje de degradación de la proteína a péptidos y aminoácidos se obtiene durante el día que se inició el estudio, ya que durante las primeras 6 horas se tiene alrededor del 50% de hidrólisis, tanto en el ensilado con antioxidante y sin antioxidante. Como se muestra en la figura 1, a partir del día 7 el proceso de hidrólisis aumenta lentamente, permaneciendo casi constante a partir del día 17 en ambos lotes. **Backhoff** (1976) en sus trabajos realizados manifiesta que el proceso de hidrólisis alcanza un 50% del nitrógeno no proteínico dentro de los tres primeros días, estimando que la velocidad es más alta durante las primeras 24 horas del proceso. En este caso el proceso de hidrólisis fue muy rápido lo cual se puede explicar por el rápido descenso de pH, lo cual pudo haber influido en la actividad de la pepsina, presente en las vísceras de pollo. Se sabe que la pepsina hidroliza algunos enlaces diferentes, especialmente entre los aminoácidos aromáticos (rompe enlaces peptídicos adyacentes a triptófano, fenilalanina, tirosina, metionina y leucina) (**Bondi, A.** 1989). La pepsina esta presente en el contenido de la molleja, y el pH de ésta es de 2 a 3.5. Siendo este mismo pH al cual se encuentra el ensilado. Las enzimas proteolíticas presentes en el tejido intestinal presentan un máximo de actividad en un medio ácido y solamente una ligera actividad en medio alcalino, lo que sugiere que la enzima en mayor concentración es la pepsina, u otra de actividad análoga a la de la pepsina (**Surkie, 1968**). Aquí se demuestra que las enzimas proteolíticas como la pepsina y las proteasas pancreáticas tienen una gran actividad enzimática, tal como lo muestra la medición de actividad enzimática en la materia prima.

Los resultados obtenidos muestran que al término del proceso de ensilaje se obtuvo un ensilado donde la mayoría del nitrógeno proteínico se hidrolizó a nitrógeno no proteínico, y de acuerdo con el análisis estadístico, no se encontró diferencia significativa en el proceso de hidrólisis entre el ensilado con antioxidante y el ensilado sin antioxidante (ver anexo C).

5.3.3 Determinación del grado de oxidación de la grasa

Durante el proceso de ensilaje se monitoreo la oxidación lipídica, para lo cual se midieron las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico expresadas como malonaldehído. Dichas mediciones se realizaron los días 0, 1, 3, 7, 17, 42 y 60. (ver cuadro 8).

Cuadro 8. Desarrollo del proceso oxidativo, durante el proceso de ensilaje.

Días	Ensilado sin antioxidante (mg de malonaldehído/Kg)	Ensilado con antioxidante (mg de malonaldehído/Kg)
0	10.05 ± 0.04	10.05 ± 0.04
1	15.06 ± 0.03	11.21 ± 0.06
3	16.59 ± 0.49	11.05 ± 0.20
7	20.59 ± 0.44	10.85 ± 0.04
17	30.33 ± 0.80	9.54 ± 0.40
42	38.62 ± 0.28	11.23 ± 0.60
60	35.41 ± 0.11	10.88 ± 0.03

Los valores fueron obtenidos por triplicado ± D.S. Con un CV menor a 2.0 %

Los cambios en los valores de malonaldehído son diferentes en el ensilado con y sin antioxidantes. Como se puede ver en la figura 2, la producción de malonaldehído es mayor en el ensilado sin antioxidante, esto debido a la oxidación del contenido de la materia grasa de las vísceras. Mientras que en el ensilado con antioxidantes, no se observa un incremento considerable en la producción de malonaldehído. Lo cual indica la efectividad de la mezcla de los antioxidantes empleados.

Evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

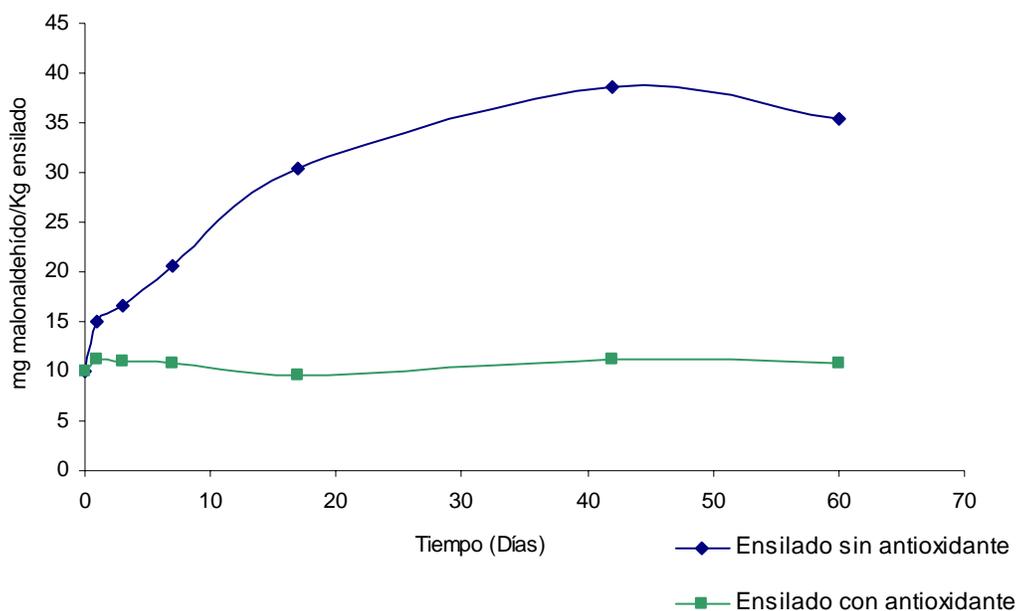


Figura 2. Evolución de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, expresadas como mg de malondehído/ kg de ensilado.

Como se puede ver en la figura 2, el contenido de malonaldehído en el ensilado con antioxidante permanece casi constante durante todo el proceso de estudio. Esto se explica por la manera de actuar de los antioxidantes empleados. Puesto que el butilhidroxitolueno (BHT) y la terbutilhidroquinona (TBHQ) son sustancias capaces de interrumpir la cadena de radicales cediendo un radical hidrógeno ($H\bullet$) a un radical lipídico libre. Estas sustancias antioxidantes disminuyen el número de radicales libres y por lo tanto disminuyen la velocidad de oxidación. Mientras que el mecanismo de acción del ácido cítrico es distinto y pertenece a otro grupo de antioxidantes que actúan impidiendo o disminuyendo la formación de radicales libres. Estos actúan complejando los metales y su acción depende del pH y de la temperatura, ya que la estabilidad de los complejos formados está en relación con estos parámetros. De esta manera, tenemos que el ácido cítrico se emplea frecuentemente por su capacidad para complejar las trazas de hierro. (Cheftel, 1976).

En el caso del ensilado que no se aplicó antioxidantes tenemos que los valores de malonaldehído aumentan conforme aumenta el período de almacenamiento. El valor obtenido al final del estudio se encuentra fuera de rangos aceptables de acuerdo con lo reportado por (Farkas y cols, 1997), ya que ellos aconsejan que en ensilajes con valores comprendidos entre 20 – 30 mg malonaldehído/Kg son aceptables y el valor aquí obtenido se encuentra ligeramente por encima de los valores aceptables.

6. CONCLUSIONES

- Se realizó el análisis proximal de la materia prima y se obtuvo que dicha materia prima esta constituida por una cantidad de proteína adecuada para llevar a cabo el proceso de ensilaje.
- Se determinó la actividad enzimática en el homogeneizado de vísceras de pollo y se encontró que la actividad enzimática es adecuada para el proceso de ensilaje y además contribuye de manera positiva en el proceso de hidrólisis de las proteínas.
- La determinación de nitrógeno no proteínico durante el proceso de ensilaje permitió conocer el avance en el proceso de hidrólisis de las proteínas. Siendo mas alta la velocidad de proteólisis durante los primeros 2 días de inicio del proceso de ensilaje.
- La adición de antioxidantes (Butilhidroxitolueno, terbutilhidroquinona y ácido cítrico) permitió evitar la oxidación de los lípidos presentes en el ensilado de vísceras de pollo.
- No se observó diferencia significativa en el proceso de hidrólisis entre el ensilado con antioxidantes y sin antioxidantes.
- Se elaboró un ensilado de vísceras de pollo. Lográndose establecer las condiciones adecuadas de pH, temperatura y tiempo para obtener un proceso de hidrólisis adecuado.
- Se obtuvo un ensilado de tipo químico con características adecuadas para su posible uso en la alimentación animal.
- Se recomienda la evaluación de la calidad proteínica del ensilado, elaborando una dieta a partir de éste para alimentación de animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

Anchía, I. A., Martínez, J. A. 2000. Alimentos. Composición y propiedades. Ed. McGraw-Hill. España. Pp 18-24.

Anson, M. L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J.Gen. Physiol.*, 22: 79-89.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. Helrich, K. Washington, D. C. 15th edition. Vol. I y II. Pp 17-18, 40-62, 69-83, 1095-1098.

Areche N., Berenz V. y León O. 1992. Desarrollo de ensilado de residuo de pescado utilizando bacterias lácticas del yogur. FAO Informe de Pesca, #441, pp.51-63, Supl. Roma, FAO.

Avdalov N., Barlocco N., Bauza R., Bertullo E., Corengia C., Giacommeti L. y Panucio A. 1992. Evaluación del ensilado biológico de pescado en la alimentación de cerdos en engorde. FAO Informe de Pesca, #441, p.88-98, Supl. Roma, FAO.

Backoff, H. F. 1976. Some chemical changes in fish silage. *J. Food Technol.* 11: 353-363.

Baez, F. 1980. Extracción y determinación de la actividad de pepsina proveniente del estómago de pescado. Tesis de maestría. Escuela de Ciencias Marítimas y Alimentarias. ITESM. Guaymas, Sonora. México. Pp 79.

Barral A.O., Castañón, C.A., Bergamaschi, N.J. y Roth, R.R. 1989. Ensilados ácidos de pescado. *La Industria Cárnica*,43: 47.

Bello R.A., Gutiérrez M., Ottati M. y Martínez A. 1992. Estudio sobre la elaboración de ensilado de pescado por vía microbiana en Venezuela. FAO Informe de Pesca, #441, pp.1-17, Supl. Roma, FAO.

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

Bello, R. y Brito, A. 1995. Experiencias con ensilado de pescado en Venezuela. FAO. Cap. I.

Bergmeyer H. U. 1988. The Lowry method. Methods of enzymatic analysis. 3th ed. Jurgen Bergmeyer and Marianne Grassl., Vol. 1, 88-91.

Bertullo E. 1989. Desarrollo del ensilado de pescado en América Latina. 2da.Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina. Montevideo, 11-15 de diciembre. FII 819/RLAC/2.

Bertullo E. 1994. Desarrollo del ensilado de pescado en América Latina. 3ra.Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina. Isla de Margarita, 21-25 de marzo. FI/RLAC/06, 18 p.

Bondi, A. 1989. Nutrición Animal. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp: 144-154.

Burtner, R. H. 1959. Processing poultry manure for fertilizer and mulch. M. S. Thesis, Ohio State University, Columbus. E. U. pp.30-33.

Campbell, J. A. 1963. Evaluation of Protein Quality, NAS-NCR Pub. 1100: 31.

Carpenter, K. J., Lea, C. H. and Parr, L. J. 1963. Chemical and nutritional changes in stored herring meal. Nutritional significance of oxidation of the oil. *Br. J. Nutr.*, 17.151-169.

Cheftel, J. C. 1976. Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Vol 1. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp: 278 – 288.

Cheftel, J. C. 1989. Proteínas Alimentarias: Bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo, modificaciones químicas. Ed. Acribia. Zaragoza, España. pp: 115-124.

Córdova E. y Bello R.A. 1986. Procesamiento y evaluación de ensilado de pescado a partir de la fauna de acompañamiento del camarón. Archivos Lat. Nutrición, XXXVI (3):522-535.

Davis, D. 1956. Feeding poultry litter fed to cattle. *Poultry Tribune* 62, No. 8, 10.

Deshmukh A. C. and Patterson, P. H. 1997. Preservation of hatchery waste by lactic acid fermentation. 1. Laboratory-scale fermentation. *Poultry Sc.*, 76: 1212-1219.

Disney, J. G., Tatterson, I. N., Olley, J. 1977. Recent developmen in fish silage. *Proc. Conference on Handling, Processing and Marketing of Tropical Fish*. London. Tropical Products Institute.

Donta, S. and Van Vunakis H. 1970. Chicken Pepsinogens and Pepsins. Their Isolation and Properties. *Biochemistry*, Vol. 9. No. 14. pp 2791.

Espe, M., Haaland, H. and Njaa, L. R. 1992a. Substitution of fish silage protein and a free amino acid mixture for fish meal protein in a chicken diet. *Journal of Science Food Agriculture* 58, 315-319.

Espe, M., Haaland, H., Njaa, L. R. and Raa, J. 1992b. Growth of young rats on diets based on fish silage with diferent degrees of hydrolysis. *Food Chemistry* 44, 195-200.

FAO. 1971. Productos pesqueros fermentados (Preparado por Mackie I.M., Hardy R. y Hobbs G., FAO Informe de Pesca Nro.100, 62p.

Farkas, J., Flores, J. D., Lineback, D. 1997. Oxidation Kinetics of menhaden oil with TBHQ. *Journal of Food Science*. 62 (3): 505-507.

Frazier, W. C. and Westhoff, D. C. 1978. Food Microbiology. 3rd ed. Ed. McGraw-Hill. E.U. pp 80.

George, J., Mountney, Ph D. 2001. Tecnología de productos avícolas. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp. 333-349.

González D., Marín M. 2005. Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos del procesamiento de sardinas. *RC*. V.15. No. 6.

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

Gutierrez F., Rojas-Bourillón A. Dormond H. 2003. Características nutricionales y fermentativas de mezclas ensiladas de desechos de piña y avícolas. *Agronomía Costarricense* 27 (1): 79-89.

Haar, N., Kariel, N., Herzberg, G., Felthman, L., Winter, K. 1985. Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminant feed supplement. *Journal of Science Food Agriculture* 36, 229-241.

Jørgensen G. and Szymeczko R. 1992. Utilization of fish silage in animal nutrition. National Institute of Animal Science. Denmark, pp.1-20.

Lee, P. A., and Close, W. H. 1987. Bulky feeds for pigs: a consideration of some non-nutritional aspects. *Livest. Prod. Sc.*, 16:395-405.

Lessi E., Ximenes Carneiro A.R y Lupin H. M. 1992. Obtención de ensilado biológico. FAO Informe de Pesca, #441, pp.64-79, Supl. Roma, FAO.

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

Lo, K. V., Liao, P. H. and Gao, Y. 1993. Effects of temperature on silage production from salmon farm mortalities. *Bioresources Technology*. 44. 33-37.

Machin, D. H. 1986. The use of formic acid preserved meat and fish offal silages in pig and poultry feeding. PhD Thesis, Reading University. 221 p.

Machin, D. H., Panigrahi, S., Bainton, J. and Morris, T. R. 1990. Performance of broiler chickens fed on low and high oil fish silages in relation to changes taking place in lipid and protein components. *Animal Feed Science Technology*. 28, 199-223.

Noland, P. H., and Ray, L. M. 1956. Poultry litter found useful in cattle feeds. *Broiler Grower* 7, 56.

Ockerman H. W., Hansen. C. L. 1994. Industrialización de subproductos de origen animal. Ed. Acribia. Zaragoza. España. Pp. 323-335.

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

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

Pérez, R. 1995. Fish silage for feeding livestock. *World Animal Rev.*, 82:34-42.

Poulter R.G. and Disney J.G. 1982. Fish silage for animal feed. *Infotish Marketing Digest*,(9): 30-32.

Raa, j. and Gildberg, A. 1982. Fish silage: A review. *Crit. Rev. Fd. Sc. Nutr.*, 16:383-419.

Santana, D. H. 2004. Desarrollo de un alimento para pollos de engorda a partir de ensilaje de pescado sierra (*Scomberomorus maculatos*). Tesis de Maestría en Ciencias de los Alimentos. Facultad de Química. UNAM. Pp 28-31.

S.A.R.H. 1980. Relación de Análisis Bromatológicos por Estado. Dirección General de Aprovechamiento Forrajero. México.

SAGRAPA, 2006 . Coordinación General de ganadería. Estimación del consumo nacional aparente 1990-2205.

<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/CNApollo.htm>.

Ultima actualización 15 de septiembre del 2006.

Surkie, Paul. 1968. Fisiología Aviar. Ed. Acribia. Zaragoza. España. pp 234.

Tatterson I.N. and Windsor M.L. 1973. Fish Silage. Torry Advisory Note No.64. Torry Research Station.

Talkington, F. D., shotts, E. B., Wooley, R. E., Whithead, W. K., and dobbins, C. N. 1981. Introduction and isolation of selected Gram-negative bacteria from fermented edible wastes. *Am. J. Vet. Sc.*,**42**: 1298-1301.

UNA, 2004. Avicultura Mexicana: monografía. Unión Nacional de Avicultores de México. May 10; 1 (2).

<http://www.una.com.mx/content/avicultura/avi01.htm>,10/05/04

Villela de Andrade M.F., Lessi E. y Franqueira Da Silva J.M. 1992. Obtención de ensilado de residuo de sardina (*Sardinella brasiliensis*, Steindachner 1879) y su empleo en la formulación de raciones de mínimo costo para aves. FAO Informe de Pesca, #441, p.115-125, Supl. Roma, FAO.

Vyncke, 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 (2): 1080-1087.

Windsor M. y Barlow S. 1984. Introducción a los subproductos de pesquería. Ed. Acribia. Zaragoza, España. Pp 101.

ANEXO A

Obtención del extracto enzimático

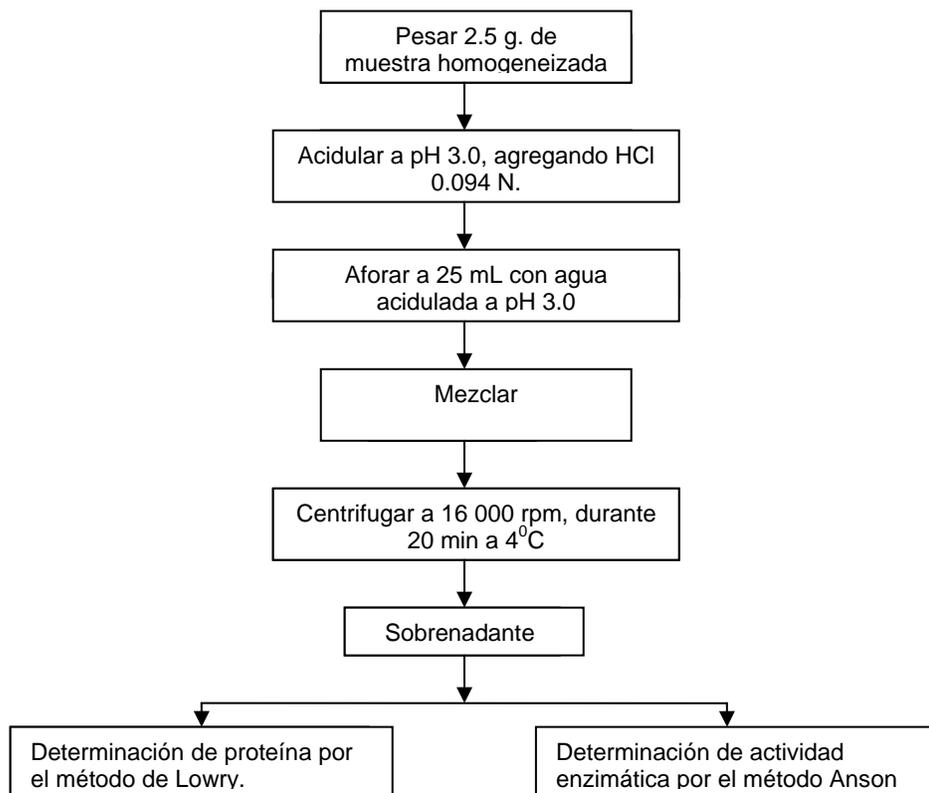


Figura A. Diagrama de trabajo para obtener el extracto enzimático.

Determinación de la actividad enzimática
(μ moles de tirosina liberados en el extracto enzimático).

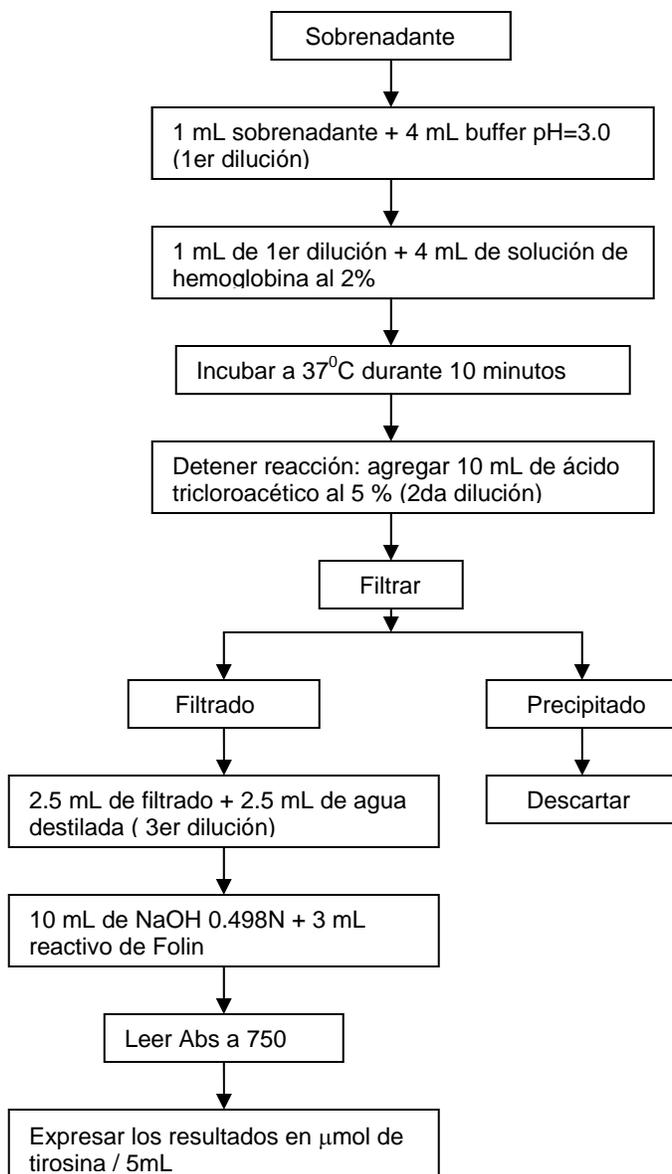


Figura B. Diagrama de trabajo para la determinación de μ moles de tirosina liberados en el extracto enzimático.

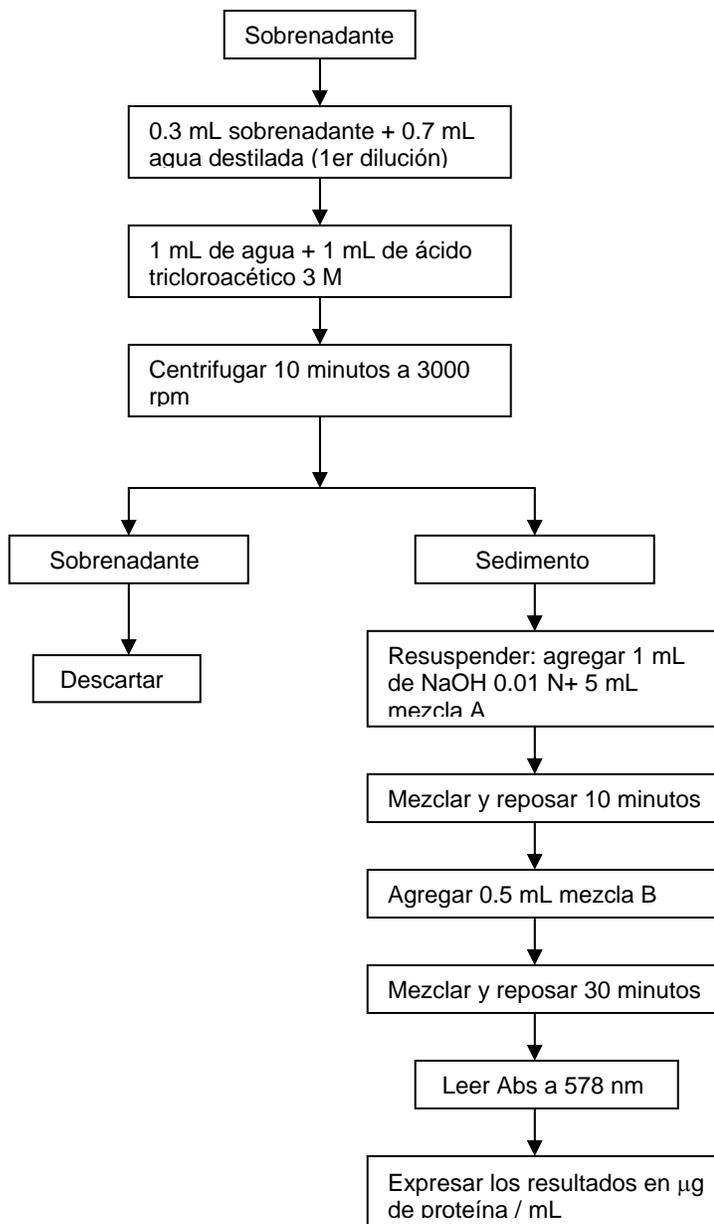
Determinación de proteína en el extracto enzimático.

Figura C. Diagrama de trabajo para la obtención de la cantidad de proteína en el extracto enzimático.

ANEXO B

Cálculos para determinar la Actividad enzimática específica

Para determinar las *unidades de actividad enzimática específica* solo se considera un ejemplo de cada cálculo, para lo cual se realizó la sustitución en cada una de las siguientes formulas:

1.- Como primer paso se obtienen los μmoles de tirosina liberados en la alícuota tomada para el ensayo a partir de la curva estándar de tirosina:

$$\text{Abs}_{750\text{nm}} = 0.8453 (\mu\text{mol tirosina}/ 5\text{mL}) + 0.0138$$

$$\begin{aligned} \mu\text{mol tirosina}/ 5 \text{ mL} &= [\text{Abs}_{750\text{nm}} - b] / (\mu\text{mol tirosina}/ 5 \text{ mL}) \\ &= [0.690 - (- 0.0138)] / 0.8453\mu\text{mol Tirosina}/5\text{mL} \\ &= (0.690 + 0.0138)/0.8453 = 0.83 \end{aligned}$$

Para conocer la cantidad de μmoles liberados por 1 gramo de muestra en 10 min., se sustituye en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \mu\text{mol Tirosina}/ \text{g} &= [(\mu\text{mol tirosina}/5\text{mL})(\text{aforo})(1\text{er dilución})(2\text{da dilucion})(3\text{er dilución})]/\text{Pm} \\ &= [(0.83/5\text{mL})(25\text{mL})(5\text{mL}/1\text{mL})(15\text{mL}/1\text{mL})(5\text{mL}/2.5\text{mL})]/2.501\text{g} \\ &= 248.90 \end{aligned}$$

Dado que los μmoles de tirosina liberados en un gramo de muestra están expresados en 10 minutos, para expresarlos por minuto únicamente se divide el resultado obtenido entre 10 minutos.

$$\begin{aligned} \text{Unidad de actividad enzimática} &= 248.90 \mu\text{mol tirosina}/10 \text{ min.} \\ &= 24.89 \mu\text{mol tirosina}/\text{min.} \end{aligned}$$

2.- Para determinar las unidades de actividad enzimática específica se expresa los μ moles de tirosina liberados en un minuto por cada mg de proteína.

Para lo cual se determina la cantidad de proteína contenida en la alícuota tomada para el ensayo a partir de la curva estándar de proteína:

$$\begin{aligned} \text{Abs}_{578\text{nm}} &= m (\mu\text{g de proteína/mL}) + b \\ \mu\text{g de proteína/mL} &= (\text{Abs}_{578\text{nm}} - b)/m \\ \mu\text{g de proteína/mL} &= [(0.297 - (-0.0053))/0.0016] = 188.94 \end{aligned}$$

Para conocer la cantidad de mg de proteína en 1 gramo de muestra, sustituir en la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \text{mg proteína/g} &= [(\mu\text{g proteína/mL})(\text{Aforo})(\text{Dilución})] / [(Pm)(1000)] \\ \text{mg proteína/g} &= [(188.94 \mu\text{g proteína/mL})(25\text{mL})(1\text{mL}/0.3\text{mL})] / [(2.501\text{g.})(1000)] \\ &= 6.29 \text{ mg} \end{aligned}$$

Finalmente con los valores obtenidos de unidad de actividad enzimática (μ mol tirosina/min) y conociendo los mg de proteína, se sustituye en la siguiente ecuación, para obtener el valor de unidad de actividad enzimática específica.

Unidad de actividad enzimática específica = Unidad de actividad enzimática/mg de proteína

$$\begin{aligned} \text{Unidad de actividad enzimática específica} &= 24.89 \mu\text{mol tirosina min}^{-1} / 6,29 \text{ mg proteína} \\ &= 3.96 \mu\text{mol tirosina min}^{-1} / \text{mg proteína.} \end{aligned}$$

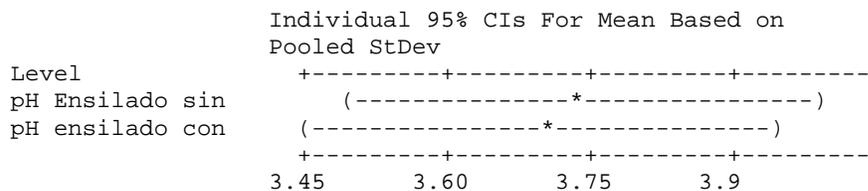
ANEXO C

One-way ANOVA: pH Ensilado sin antioxidante, pH ensilado con antioxidante

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	0.014	0.014	0.06	0.816
Error	34	8.891	0.262		
Total	35	8.906			

S = 0.5114 R-Sq = 0.16% R-Sq(adj) = 0.00%

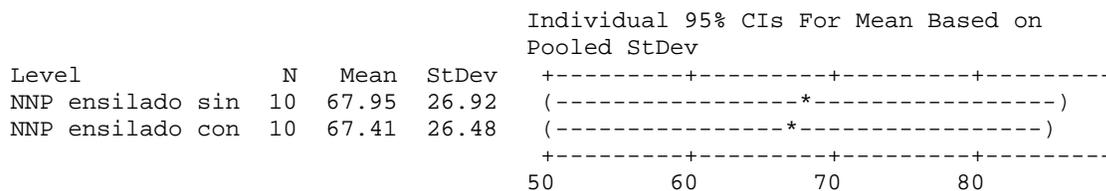
Level	N	Mean	StDev
pH Ensilado sin	18	3.7406	0.4949
pH ensilado con	18	3.7006	0.5274



One-way ANOVA: NNP ensilado sin antioxidantes, NNP ensilado con antioxidantes

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	1	1	1	0.00	0.965
Error	18	12830	713		
Total	19	12831			

S = 26.70 R-Sq = 0.01% R-Sq(adj) = 0.00%



Pooled StDev = 26.70