

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



ENSILAJES ACIDOS DE PESCADO EFECTO DE PRECALENTAMIENTO Y DE LA ADICION DE LOS ACIDOS FOSFORICO Y CITRICO SOBRE SU CALIDAD BIOQUIMICA

**DEFENSA DE TESIS QUE PRESENTA:
MARIA DEL CARMEN NAVA LOPEZ
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

Ensenada, Baja California, Abril de 1993

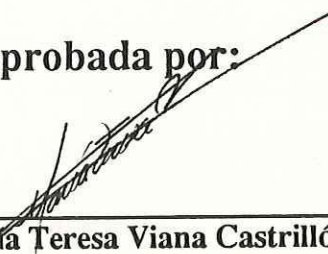
RESUMEN

Los ensilajes ácidos de pescado son un método de preservar los productos pesqueros a temperatura ambiente, mediante la adición de ácidos. El producto tiene consistencia líquida debido a la hidrólisis que provocan las enzimas endógenas del pescado (autólisis) y a los ácidos que se adicionen. La industria pesquera de la región, genera gran cantidad de subproductos que tradicionalmente se utilizan en la producción de harina de pescado para alimento animal. Con el método de ensilar, se pueden aprovechar los subproductos pesqueros para producir alimento animal a bajo costo. Se ensilaron macarelas enteras (*Scomber japonicus*), con dos mezclas diferentes de ácidos para observar las diferencias en su efectividad preservativa: mediante la adición de ácidos convencionales, sulfúrico-acético, y los ácidos fosfórico-cítrico. Con el fin de establecer el grado de hidrólisis provocado por la actividad enzimática, las enzimas se inactivaron calentando el pescado a 60° durante 5 minutos, adicionando posteriormente la mezcla de ácidos fosfórico-cítrico. Durante 90 días se tomaron muestras y se analizaron. Se encontró que el pH se mantuvo estable en los tres tratamientos. La actividad enzimática en el tratamiento precalentado pudo ser controlada obteniéndose un ensilaje más estable, con menor porcentaje de líquido, así como menor cantidad de proteína soluble y aminoácidos libres. No obstante, después del día 60 de almacenamiento, se observó, en los tres tratamientos, un incremento en la cantidad de bases volátiles totales, lo cual indica un inicio de descomposición, que puede ser atribuible a las altas temperaturas de almacenamiento registradas durante el tiempo de muestreo. Se concluye que el tratamiento precalentado presenta ventajas sobre los otros dos tratamientos, debido a su bajo porcentaje de hidrólisis el cual refleja una menor concentración de proteína soluble y aminoácidos libres, los cuales en altas cantidades no son nutricionalmente aprovechables.

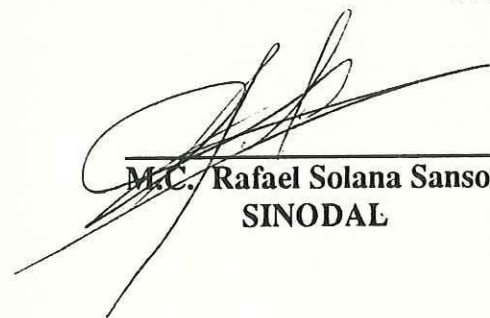
**ENSILAJES ACIDOS DE PESCADO
EFECTO DE PRECALENTAMIENTO Y DE LA
ADICION DE LOS ACIDOS FOSFORICO Y CITRICO
SOBRE SU CALIDAD BIOQUIMICA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS,
PRESENTA:
MARIA DEL CARMEN NAVA LOPEZ**

Aprobada por:



**Dra. María Teresa Viana Castrillón
DIRECTORA DE TESIS**



**M.C. Rafael Solana Sansores
SINODAL**



**Dr. Jorge De la Rosa Velez
SINODAL**

a Aura

a Claudia

y a todas las personas que nos aman...

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

A Carmelita, Popiano, Enrique y Lalo...por todo.

A Pancho y María Teresa..... gracias maestros....

A Pilar y Don Pancho

A mis compañeros...Sonia, Charly, Lucy, Alejandra, Elda, Berenice, Ruth, Marco, Saúl, Soledad, Roberto, Manuel, Sr. Medina, Sergio.

A la vecina y Daniel, Isabel, Lupilla, Irma y Juan, Elsa y Jose Luis.

A TECMAR, S.A de C.V., por su aportación para la realización de este trabajo.

A la Pescadería Bahía de Ensenada... en especial a Don Yesy.

**Y a todas las personas que compartieron su tiempo y espacio conmigo...
gracias.**

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	4
II.1. SUBPRODUCTOS PESQUEROS EN MEXICO Y EN EL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA.....	4
II.2. DIFERENTES MANERAS DE UTILIZAR LOS SUBPRODUCTOS DE LA PESCA	8
II.3. PRODUCCION DE ALIMENTO PARA ANIMALES DOMESTICOS Y PARA ACUACULTURA.....	9
II.4. GENERALIDADES DEL ENSILAJE DE PESCADO ENSILAJES ACIDOS DE PESCADO:.....	11
III. OBJETIVO	13
IV. METODOLOGIA	
IV.1. MATERIA PRIMA Y ELABORACION DEL ENSILAJE	14
IV.2. MUESTREOS	
IV.2.1. TOMA DE MUESTRAS	16
IV.3. EVALUACION	
PORCENTAJE DE LIQUIDO	16
ACTIVIDAD ENZIMATICA	17

PROTEINA SOLUBLE	17
AMINOACIDOS LIBRES	18
CUANTIFICACION DE BASES VOLATILES TOTALES, TRIMETILAMINA Y AMONIO	18
ANALISIS DE DATOS	19

V. RESULTADOS

V.1. MATERIA PRIMA	20
V.2. ENSILAJES ACIDOS	
TEMPERATURA Y pH	21
PORCENTAJE DE LIQUIDO	24
ACTIVIDAD ENZIMATICA	26
PROTEINA SOLUBLE	28
AMINOACIDOS LIBRES	29
BASES VOLATILES TOTALES	32
TRIMETILAMINA	33
AMONIO	36

VI. DISCUSIONES

VI.1. MATERIA PRIMA	38
VI.2. ENSILAJES	
VI.2.1. pH Y TEMPERATURA	41
VI.2.2. PORCENTAJE DE LIQUIDO Y ACTIVIDAD ENZIMATICA	42
VI.2.3. PROTEINA SOLUBLE Y AMINOACIDOS LIBRES	44
VI.2.4. BASES VOLATILES TOTALES (BVT), TRIMETILAMINA	

(TMA) Y AMONIO	45
VII. CONCLUSIONES	49
VIII. BIBLIOGRAFIA	51
APENDICE	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Productos pesqueros procesados en la Industria Reductora de Ensenada en 1991.....	6
Figura 2. Valor promedio del porcentaje de líquido en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante su almacenamiento.....	25
Figura 3. Actividad enzimática de los diferentes ensilajes, dada en $\mu\text{mol TYR eq /ml} \times \text{h.}$, utilizando hemoglobina como substrato.....	27
Figura 4. Proteína soluble en los diferentes ensilajes, dada en mg de proteína /g de ensilaje.....	30
Figura 5. Cantidad de aminoácidos libres en los diferentes tratamientos, dada en mg de proteína /g de ensilaje.....	31

Figura 6. Bases volátiles totales (BVT) en los ensilajes AFC, IFC y ASA, en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.....	34
--	----

Figura 7. Cantidad de trimetilamina (TMA), dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.....	35
---	----

Figura 8. Cantidad de amonio en los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.....	37
--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Composición de los diferentes tratamientos AFC, IFC y ASA.....	15
---	----

Tabla II. Características iniciales de la materia prima. Pescado molido, crudo y precalentado antes de mezclar los ácidos.....	21
---	----

Tabla III. Valores promedio de pH de los tratamientos AFC, IFC y ASA, y de la temperatura ambiente a la cual fueron almacenados.....	23
---	----

Tabla IV. Valores promedio del porcentaje de líquido presente en los tratamientos AFC, IFC y ASA.....	57
--	----

Tabla V. Valores promedio de la Activiada Enzimática de los diferentes tratamientos AFC, IFC y ASA, dado en $\mu\text{mol Tyr eq}/\text{ml} \times \text{h}$	57
---	----

Tabla VI. Valores promedio del contenido de Proteína Soluble en los diferentes tratamientos, AFC, IFC y ASA dada en mg de proteína /g de ensilaje.....	58
--	----

Tabla VII. Valores promedio de la cantidad de aminoácidos libres de los diferentes tratamientos AFC, IFC y ASA, dados en mg de proteína /g de ensilaje.....	58
---	----

Tabla VIII. Resultados de los promedios de la cantidad de bases volátiles totales, determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en μmol de N /100 g de ensilaje.....	59
--	----

Tabla IX. Resultados de los promedios de la cantidad de tremetilamina determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en μmol N /100 g de ensilaje.....	59
--	----

Tabla X. Resultados de los promedios de la cantidad de amonio determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en μmol amonio /100 g de ensilaje.....	60
---	----

I. INTRODUCCION

Ensilar es el proceso de guardar alimento en un silo tratando de conservar sus características nutritivas (Gildberg, 1982). Entonces, el ensilaje ácido de pescado es una manera de preservar productos pesqueros a temperatura ambiente mediante la adición de ácidos. La conservación del producto se logra a través del efecto de los ácidos sobre las poblaciones de bacterias que se encuentren presentes. El producto terminado tiene consistencia líquida debido al alto grado de hidrólisis que se produce durante su almacenamiento, y puede ser utilizado como complemento alimenticio en animales domésticos y en acuicultura (Windsor & Barlow, 1984).

El alto grado de hidrólisis no se debe únicamente a la acción de los ácidos, sino también a la disminución del pH que estos ocasionan. De esta manera se forma el ambiente propicio para las enzimas ácidas que se encuentran presentes en el pez, las cuales al activarse llevan a cabo un intenso proceso de hidrólisis (autólisis).

La actividad enzimática es considerada como la causa principal de licuación en ensilajes de pescado (Gildberg, 1982), y es la responsable directa de la hidrólisis de las proteínas aún después de largo tiempo de almacenamiento. Al hidrolizarse las proteínas son fragmentadas a sus unidades elementales (aminoácidos), que en forma libre, algunos de ellos son inestables y se degradan (Stone & Hardy, 1986). Se sabe que un alimento con alta concentración de aminoácidos libres no proporciona un buen aprovechamiento alimenticio (Backhoff, 1976)

Cabe aclarar que además de la hidrólisis ácida provocada por los ácidos y la autólisis producida por las enzimas, existen otros factores externos como la temperatura y el tipo de producto pesquero, que influyen en el grado de licuación del ensilaje (Backhoff, 1976). Estos cambios definen el estado físico del ensilaje, así como su valor nutricional.

El ensilaje de pescado puede ser elaborado a partir de la totalidad del pescado o de partes del mismo (Åsgård & Austreng, 1986), así como de fauna de acompañamiento de especies de alto valor comercial (Viana-Castrillón, 1982). Es por esto que puede ser una alternativa de bajo costo si se usan productos de desecho de la industria pesquera.

Nuestro país tiene más de 11,000 km de litorales ricos en diversidad y abundancia de organismos marinos. La industria pesquera, obtiene productos alimenticios para consumo humano y animal de los organismos marinos que son capturados. Los ensilajes de pescado son una magnífica opción como fuente de alimentos para animales, ya que pueden ser usados los desechos de la industria pesquera, obteniéndose un producto de bajo costo, con buena calidad de proteína.

El volumen de producción pesquera nacional en 1989 fue de 1,519,882 toneladas (Anuario estadístico de pesca 1989, 1991), de donde tan solo el 2.77% de los subproductos que se generaron en la industria (desperdicios y fauna de acompañamiento de especies de alto valor comercial, así como pescado no apto para consumo humano) fue destinado a la producción de harina de pescado. Esta cifra es muy baja, si se considera que un 40% del peso total del pez corresponde a cabeza, vísceras y cola. La causa principal es que en la mayoría de las ocasiones sólo se procesa el subproducto generado en áreas cercanas a las plantas reductoras de harinas. Se ha observado que

existe mayor aprovechamiento de los productos pesqueros cuando las empresas enlatadoras tienen integrada la industria reductora (Moctezuma-Hernández & Álvarez-López, 1989), y no cuando hay que transportarlos, ya que con frecuencia no llegan en buenas condiciones de frescura.

La harina de pescado hecha a base de pescado entero, constituye una fuente importante de proteína para la alimentación animal, mientras que la harina producida a partir de subproductos, es de calidad inferior. Esto se debe, a que los huesos poseen un alto porcentaje de cenizas, así como a que la proteína de piel y vísceras, es de menor digestibilidad, por su alto contenido de colágena. No obstante, es la solución para producir un alimento animal de bajo costo.

Estas dos formas de procesar los subproductos de pescado, en harina y ensilaje, son usadas tanto en países industrializados, como en vías de desarrollo. En Norteamérica la mayoría de los subproductos son transformados en harinas. Esto es debido al alto contenido de líquido que contienen los ensilajes, lo cual repercute en la economía de su transportación, además de que los granjeros y acuacultores de dicho país, tradicionalmente utilizan ingredientes alimenticios secos (Spinelli, 1983). En cambio en Europa los ensilajes ácidos de pescado se utilizan desde hace muchos años, donde el transporte en barco resulta ser muy accesible y económico. El proceso de ensilar da como resultado una buena alternativa en la producción de alimento animal a un costo menor que el de las harinas de pescado. Es por esto que los ensilajes son una opción atractiva en países que carecen de una industria especializada o de los recursos económicos para adquirirla.

En el presente trabajo se elaboraron ensilajes de subproductos marinos utilizando una mezcla de ácidos orgánicos e inorgánicos. Se usaron mezclas de los ácidos sulfúrico-acético tradicionalmente utilizados y los ácidos fosfórico-cítrico, por considerar al ácido cítrico de más fácil manejo. Esto, con el propósito de comparar la calidad preservativa, entre un tipo de ensilaje tradicional y el elaborado con los otros ácidos.

Con el fin de observar el efecto de las enzimas en la hidrólisis, se elaboró un tratamiento en donde las enzimas fueron desnaturalizadas térmicamente; de esta manera la actividad enzimática pudo ser reducida, dando lugar a un menor porcentaje de hidrólisis.

El estudio de los cambios bioquímicos que ocurren durante la elaboración, estabilidad y almacenamiento de los ensilajes ácidos de pescado, proporcionarán el conocimiento necesario para obtener ensilajes con la mejor calidad posible.

II. ANTECEDENTES

II.1 SUBPRODUCTOS PESQUEROS EN MEXICO Y EN EL ESTADO DE BAJA CALIFORNIA

En el litoral del Pacífico de la República Mexicana se encuentran ubicados puertos e industrias pesqueras de gran importancia para el país. En 1989, del volumen total de producción pesquera, el 76.86 % correspondió a este litoral. En el estado de Baja

California, el cual tiene tradición pesquera desde hace más de 60 años, se capturó en 1989 el 18.22 % del volumen de producción pesquera del país, o sea, el 23.70% del litoral del Pacífico. De donde, en el Municipio de Ensenada, considerado el puerto principal de Baja California, se obtuvo para 1988, el 15.68 % y para 1989 el 17.06 %, del volumen total de pesca en México (Anuario estadístico de pesca, 1989, 1991).

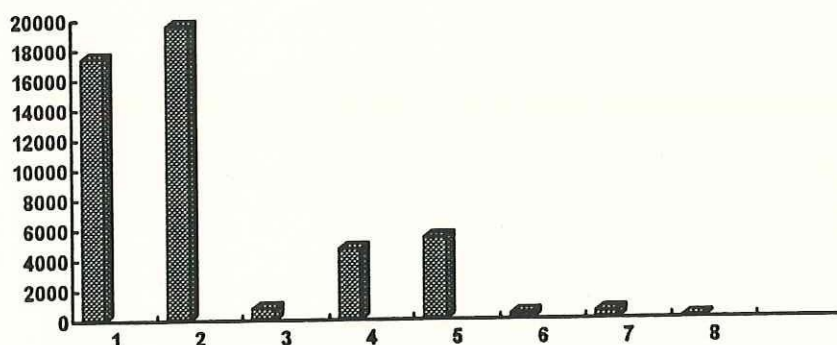
En Baja California se estableció un gran número de plantas privadas de la industria pesquera a partir de 1961, cuando se creó la Comisión Nacional Consultiva de Pesca (CNCP). Las metas de la CNCP fueron desde el principio, la alimentación popular y la industrialización de productos marinos, destacando el atún y la sardina, así como la industria reductora, orientada a la elaboración de harina de pescado.

En el puerto de Ensenada, B.C. se encuentra localizada gran parte de la industria procesadora de los productos pesqueros. De esta manera se tiene que en el Municipio de Ensenada se concentra el 53.58 % de la industria procesadora de productos pesqueros del estado.

La zona cuenta con dos tipos de industria, las empacadoras o enlatadoras y las reductoras (producción de harina de pescado), siendo estas últimas de gran importancia, ya que se encargan de procesar, además de pescado entero capturado con ese fin, el subproducto pesquero que se obtiene de las industrias empacadoras: Aletas, vísceras, cabezas y la fauna de acompañamiento de especies de alto valor comercial, así como el pescado que se encuentre no apto para consumo humano (Moctezuma- Hernández & Alvarez-López, 1989).

Todas las industrias reductoras de Baja California se encuentran en el Municipio de Ensenada, comprendiendo el puerto de Ensenada, El Sauzal de Rodríguez e Isla Cedros, con una capacidad instalada de 1,790,690 ton/año, y una utilización real de 172,800 ton/año (Moctezuma- Hernández & Alvarez-López, 1989). La utilización real está determinada principalmente por la cantidad de materia prima que ingresa a las plantas reductoras, la cual no es constante debido a las condiciones meteorológicas que se presenten durante el año.

En 1991, en la industria reductora, se procesaron 48,973 ton (producto húmedo), de los cuales se obtuvieron 9,638 ton de harina de pescado. La materia prima utilizada fue de macarela y sardina entera, en algunas ocasiones anchoveta, atún y barrilete enteros, y los subproductos de las enlatadoras de sardina, macarela y atún (Figura 1) (com. per. Medina, 1992).¹



1. Macarela; 2. Sardina; 3. Subproducto de Macarela; 4. Subproducto de Sardina; 5. Subproducto de Atún; 6. Subproducto de Sardina y Atún; 7. Anchoveta; 8. Atún

Figura 1. Productos pesqueros procesados en la Industria Reductora de Ensenada en 1991 (Com. per. Medina, 1992).

¹Medina, I. (1992) Secretaría de Pesca, Ensenada, B.C. Área de Comercialización

La industria reductora ha sido de beneficio para la región, permitiendo la utilización de los subproductos de la industria pesquera para harina de pescado. Esta se utiliza como insumo intermedio en otros procesos industriales, tales como alimento balanceado para animales domésticos, y en la elaboración de fertilizantes (Moctezuma-Hernández & Alvarez-López, 1989).

No obstante el beneficio que ha aportado, ha también repercutido en algunos aspectos ecológicos: del 100 % en peso húmedo de los subproductos pesqueros que fueron procesados en las industrias reductoras de la región en 1991, se obtuvo un rendimiento del 19.68 %, redundando en beneficio de la región, mientras que aproximadamente el 80 % del peso húmedo fue desechado en forma líquida. Los desechos de las industrias reductoras se vierten a la Bahía de Todos Santos, contaminando de esta manera el agua, además, el proceso de evaporación ocasiona el desprendimiento de malos olores y partículas que contaminan el ambiente cuando no se cuenta con un sistema adecuado de filtros en las pipas o chimeneas.

Hasta el momento ninguna industria pesquera de la región y el país a contemplado como alternativa para la disminución de costos y de contaminación, el proceso de ensilaje para la conservación de subproductos pesqueros.

II.2 DIFERENTES MANERAS DE UTILIZAR LOS SUBPRODUCTOS DE LA PESCA

En la búsqueda de alternativas diferentes a las tradicionales, y que aporten más beneficios que los métodos que se utilizan actualmente en México, se propone que: ensilar los subproductos pesqueros es una opción que podría utilizarse en forma paralela con las plantas reductoras, en zonas donde se genere el subproducto y su traslado a las plantas reductoras sea costosamente inaccesible.

Ambos procesos, fabricación de harina y generación de ensilajes, utilizan energéticos, aunque de diferente manera: uno para obtener un producto seco y otro para transportar un producto húmedo, siendo este último el menos costoso aún si se transporta el ensilaje hasta 130 km de distancia (Raa & Gildberg, 1982). El ensilaje es una buena alternativa como fuente de proteínas en la acuicultura, por lo cual es posible encontrarle un uso cercano a su sitio de producción.

De acuerdo a las características de los ensilajes, se obtiene un producto húmedo y casi estéril, el cual requiere de poca energía para su elaboración, y por lo tanto de infraestructura poco costosa, conservando su olor fresco (aún en climas tropicales). Este constituye una fuente protéica que sirve como complemento alimenticio para animales domésticos (Raa & Gildberg, 1982), así como para la acuicultura (Åsgård & Austreng, 1986), o bien, como fertilizante (Departments of food science and meat and animal science, 1976).

II.3 PRODUCCION DE ALIMENTO PARA ANIMALES DOMESTICOS Y PARA ACUACULTURA

La necesidad de producir insumos que puedan ser almacenados para asegurar la alimentación de animales domésticos, así como para acuicultura, ha llevado a la implementación de métodos que ayuden en esa labor (Åsgård & Austreng, 1986). La utilización de ensilajes de pescado en la alimentación de animales de granja ha dado buenos resultados. Se han utilizado diferentes tipos de ensilajes, como complemento alimenticio en aves de corral, cerdos y vacas (Windsor & Barlow, 1984; Cook, 1984). Pruebas de palatabilidad y valor nutricional, utilizando ensilajes como complemento alimenticio en vacas Angus y Herford durante 180 días, proporcionaron buenos resultados, ya que se redujo el costo de alimentación entre el 10 y el 20 %, sin afectar el sabor de la carne (Cook, 1984). En la alimentación de cerdos ha demostrado tener la misma calidad que los alimentos proteínicos convencionales.

También en la acuicultura los ensilajes han sido ampliamente utilizados como complemento en la elaboración de dietas (Hardy *et al*, 1983; Åsgård & Austreng, 1986; Stone *et al*, 1989). Los resultados presentan un coeficiente de conversión alimenticia semejante al que se observa con harinas de pescado, a un menor costo (Raa & Gildberg, 1982). El ensilaje ácido de pescado es una buena fuente alimenticia para salmones ya que se obtienen resultados similares a los obtenidos con materia prima fresca (Raa *et al*, 1983).

En estudios comparativos entre ensilajes, hechos en Alaska en el Centro de Pesca del Estado, encontraron que el ensilaje de pescado de 4 semanas de almacenamiento,

utilizado como alimento para trucha, dio por resultado un crecimiento superior al obtenido con ensilaje de 16 semanas, así como en los casos que se administró como única fuente protéica, dio resultados más pobres que utilizando harina de pescado (Wekell, 1981) Esto se obtuvo sin haber neutralizado el ensilaje, de tal manera, que éste se encontraba a pH 4; algunos organismos como las truchas no toleran alimentos ácidos. Sin embargo, cuando se mezcló con otras fuentes protéicas, como harina de pescado, pluma y soya, mostró resultados similares a los de cualquiera de las harinas mencionadas por separado. La mezcla disminuye el costo del alimento y da un máximo aprovechamiento de las proteínas (Wekell, 1981; 1982).

Cabe aclarar que la acidez del producto alimenticio elaborado a partir del producto del ensilaje y otra fuente alimenticia, depende de la cantidad de ensilaje que se mezcle con esta otra, ya que de acuerdo con Wekell (1981; 1982) en dietas para trucha, no hubo diferencias significativas entre el ensilaje mezclado con la dieta estándar al 35 % en peso húmedo (con o sin neutralizar), comparado con su propio alimento.

Por lo anterior, es conveniente realizar la neutralización de los ensilajes; sin embargo, debe hacerse con cuidado, ya que al neutralizar se forman sales. Ringo (1991) realizó un estudio sobre los efectos de la adición de sales de propionato y lactato de sodio en la dieta alimenticia de *Salvenius alpinus* (L.); y encontró que el alimento que contenía propionato de sodio provoca diarrea en peces, mientras que con el lactato de sodio los organismos no sufren tales trastornos, inclusive, observó que el alimento comercial provoca trastornos digestivos y que las dietas con lactato de sodio restablecen la salud de los organismos.

II.4 GENERALIDADES DEL ENSILAJE DE PESCADO

Existen varios tipos de ensilajes de pescado: ensilajes fermentados, ensilajes básicos y ensilajes ácidos. Solo se expondrán las generalidades del ensilaje ácido por ser de interés para el presente trabajo.

ENSILAJES ÁCIDOS DE PESCADO:

Se ha utilizado la adición de ácidos desde 1920 para producir ensilajes de diferentes alimentos de origen terrestre. Con este método se logra conservar alimento manteniendo el valor nutritivo para su posterior utilización. Este método de preservación fue adoptado por Edin en 1930, para producir ensilajes ácidos de pescado (Backhoff, 1976).

Actualmente se producen y se utilizan como complemento alimenticio, tanto en granjas para animales domésticos, como en la acuicultura. Son los países europeos los que elaboran ensilajes ácidos a nivel comercial. En Dinamarca, por ejemplo, se producen a nivel industrial desde 1950 y en Noruega y Polonia entre otros, se practican mayormente. Se sabe que en países en vías de desarrollo como en la India también son utilizados (Raa & Gildberg, 1982).

Inicialmente se utilizaron solo ácidos inorgánicos para la elaboración de ensilajes de productos pesqueros. Con la adición de estos ácidos, debe someterse el ensilaje a valores de pH muy bajos (pH 2, aproximadamente), lo que requiere de gran cantidad de ácido, debido a la alta capacidad amortiguadora que posee el pescado, (Gildberg, 1982).

Cuando se quiera utilizar el ensilaje para alimentación, el ensilaje deberá de neutralizarse utilizando carbonato de calcio y/o sodio del 2% al 5% peso/vol (Raa & Gildberg, 1982). A mayor cantidad de ácido se producirá mayor cantidad de sales al neutralizarlo, lo cual repercutirá en los organismos que sean alimentados con el, provocándoles problemas digestivos, además de un retardo en el crecimiento (Gildberg, 1982; Wekel, 1982; Ringo, 1991).

Por otra parte los ácidos inorgánicos, a pesar de ser fuertes acidificadores, no poseen actividad antimicrobiana efectiva, ya que se encuentran en su forma disociada a pH cercano a 4, por lo que no penetran dentro de las células bacterianas (Raa *et al*, 1983).

Los ácidos orgánicos han probado ser superiores que los ácidos minerales en su eficacia preservativa, especialmente debido a su propiedad antifungal (Raa *et al*, 1983). No obstante, los ácidos orgánicos poseen diferencias en su efectividad antifungal. Raa y Gildberg (1982) establecen que el ácido fórmico cuyo pKa es de 3.75, no brinda ninguna protección contra los hongos en ensilajes a pH entre 3.5 y 4.0. En cambio, el ácido propiónico, cuyo pKa es de 4.86, es muy efectivo.

La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos se debe a que sus pK son mayores, permitiéndoles estar en forma no disociada a un pH cercano a 4. Al no estar disociados los ácidos, pueden atravesar libremente las membranas bacterianas (Gildberg, 1982). Ya adentro de la célula en donde el pH es aproximadamente neutro, el ácido se disociará, y el protón y el anión resultantes quedarán atrapados. Así, con la acumulación de aniones dentro de la célula, el pH irá decreciendo, produciéndose la intoxicación de ésta. La

inhibición de hongos, al igual que el efecto bactericida, varía con el pH dependiendo del pKa del ácido (Raa & Gildberg, 1982), y es por esto que la efectividad de cada uno de los ácidos orgánicos dependerá entonces, de su propio pKa.

La limitante en la utilización de ácidos orgánicos radica en que su costo es más elevado que el de los ácidos inorgánicos. Es por esto que actualmente la mezcla de ácidos orgánicos e inorgánicos se utiliza para la elaboración de ensilajes, con más éxito que la utilización única de cada uno de ellos por separado.

Cabe mencionar que además los ácidos influyen en la aceptación de los ensilajes. Åsgård y Austreng (1986) en pruebas de alimentación de salmón del Atlántico con ensilajes elaborados con diferentes mezclas de ácidos, observaron que el pez mostraba menor aceptación por las dietas en las cuales se incluía ensilaje con ácido sulfúrico y propiónico, que con las que contenían ácido fórmico.

III.OBJETIVOS

- Probar un método de preservación de subproducto pesquero de la región, y plantear su aprovechamiento.
- Observar y analizar el efecto de precalentado y preservación ácida sobre la calidad bioquímica de los ensilajes.
- Comparar las características bioquímicas de ensilajes tradicionales y los propuestos.

IV. METODOLOGIA

IV.1. MATERIA PRIMA Y ELABORACION DEL ENSILAJE

Uno de los productos pesqueros de los cuales se obtienen gran cantidad de subproductos de la región es la especie *Scomber japonicus*, conocida como macarela. En el presente trabajo se utilizó macarela entera proporcionada por TECMAR, S.A. de C.V.

A 125 kg de macarela entera sin cabeza y espina dorsal, se molieron en un molino de carne comercial marca Sunbeam Ar-905 (Pescadería Bahía en Ensenada, B.C.), con un tamaño de partícula aproximado a 0.5 cm, de acuerdo con Raa y Gildberg (1982). Una vez molido, se homogeneizó a mano con cucharas de madera por espacio de 30 minutos. Una muestra de 100 g, fue separada y congelada a -25°C para su posterior análisis en el laboratorio.

El pescado molido se dividió en tres partes iguales. Una parte fue calentada hasta alcanzar 60°C , temperatura que se mantuvo por espacio de cinco minutos. Se separó una muestra y se congeló a -25°C para su posterior análisis en el laboratorio. La adición de los ácidos a la materia prima se realizó a una temperatura aproximada de 30°C .

A dos partes (una cruda y una calentada), se les agregó por separado 2.55% (v/p) de ácido fosfórico, 3% (p/p) de ácido cítrico y 0.1% (p/p) de benzoato de sodio (como conservador). Los ensilajes se homogeneizaron a mano por espacio de 30 minutos. A

los ensilajes obtenidos de esta manera se les denominó **AFC** (activado fosfórico cítrico) e **IFC** (inactivado, o sea precalentado, fosfórico cítrico)

Como control se utilizó ácido sulfúrico y acético. A la tercera parte restante (cruda) de pescado, se le agregó ácido sulfúrico hasta alcanzar un pH de 3, posteriormente se añadió 2% (v/p) de ácido acético y 0.1% (p/p) de benzoato de sodio, homogeneizando de igual manera. A este tratamiento se le llama **ASA** (activado sulfúrico acético)

Los tres ensilajes se dividieron, y se obtuvieron 3 réplicas de cada uno (ver Tabla I), los cuales se almacenaron, a temperatura ambiente, en 9 contenedores (20 l de capacidad) de plástico con tapa.

Durante los primeros días de almacenamiento, el ensilaje se mezcló diariamente, para garantizar un producto homogéneo, de acuerdo con lo propuesto por Neave (1986).

Tabla I. Composición de los diferentes tratamientos **AFC** **IFC** y **ASA**

Ingredientes	AFC	IFC	ASA
Macarela molida	cruda	precalentada	cruda
Ac. Fosfórico	2.55 % (v/p)	2.55 % (v/p)	-
Ac. Cítrico	2.55 % (p/p)	2.55 % (p/p)	-
Ac. sulfúrico	-	-	hasta alcanzar un pH de 3
Ac acético	-	-	2 % (v/p)
Benzoato de Na	0.1 % (p/p)	0.1 % (p/p)	0.1 % (p/p)

IV.2. MUESTREOS

IV.2.1. TOMA DE MUESTRAS

Se obtuvieron muestras del pescado crudo y calentado, con el fin de evaluar la calidad de la materia prima antes de mezclar los ácidos. Para la toma de muestras, primero se mezcló perfectamente el ensilaje con un cucharón de madera. Después, se tomaron 100 ml de ensilaje en una probeta para la separación de muestras. Las muestras fueron guardadas en bolsas de plástico por triplicado y almacenadas a -25°C (dando por resultado nueve réplicas, considerando que los tratamientos se hicieron por triplicado) para su posterior análisis. Los muestreos se realizaron los días 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 y 90.

IV.3. EVALUACION:

PORCENTAJE DE LIQUIDO

El porcentaje de líquido se obtuvo contrifugando a una Fuerza Centrífuga Relativa (FCR) de $16,000 \times g$ durante 20 minutos y midiendo el volumen del líquido con respecto al sólido.

ACTIVIDAD ENZIMATICA

La actividad enzimática fue determinada de acuerdo al método de Barret (1972, en Gildberg, 1982) El método consiste en incubar 0.5 ml de solución amortiguadora de Johnson & Lindsay (Johnson & Lindsay, 1939, en Gildberg, 1982), con 0.25 ml de fase acuosa del ensilaje al 10 % y 0.25 ml de hemoglobina al 8% como sustrato, durante una hora a 37°C. Después de adicionar 5 ml de ácido tricloroacético al 6%, se midió la concentración de proteína en el sobrenadante por el método de Lowry (Lowry *et al*, 1951), utilizando tirosina como estándar, en un espectrofotómetro a 700 nm de densidad óptica. Para el blanco se utilizaron los mismos componentes sólo que el ácido tricloroacético se adicionó antes de la incubación. La diferencia entre los valores de absorbencia de la fase acuosa del ensilaje y el blanco, dividida entre la absorbencia de la tirosina y multiplicada por un factor, originado de la cantidad de tirosina, tiempo de incubación, y mililitros de ensilaje utilizados, dan como resultado la actividad enzimática. Actividad que realizan las enzimas presentes en el ensilaje reportada como $\mu\text{mol de tyr eq /ml x h}$.

PROTEINA SOLUBLE

La estimación de proteína soluble, se realizó tomando un gramo de ensilaje, el cual se centrifugó a una FCR de 16,000 x g, durante 20 minutos, y al sobrenadante se le determinó la cantidad de proteína soluble por el método de Lowry *et al*, (1951) utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) para la curva de calibración. Los resultados se reportan en mg de proteína /g de ensilaje.

AMINOACIDOS LIBRES

Los aminoácidos libres se calcularon después de adicionar un 10% de ácido tricloroacético (TCA) a la fase líquida de los ensilajes, para precipitar la proteína. La cuantificación se realizó por el método de Lowry *et al*, (1951), y se reporta en mg de proteína /g de ensilaje.

CUANTIFICACION DE BASES VOLATILES TOTALES, TRIMETILAMINA y AMONIO

Las bases volátiles totales (BVT) incluyen principalmente a la trimetilamina (TMA) y amonio, donde la determinación de la cantidad presente se usó como un indicativo del estado de conservación de la materia prima.

La cuantificación de BVT, TMA y amonio, se realizó por el método de Conway (1933) modificado. El principio del método consiste en la absorción de las sustancias volátiles, por simple difusión gaseosa, de una celda en donde se ejerce una cierta tensión, hacia otra en donde la tensión superficial de un líquido absorbente es cero. La modificación consiste en la utilización de microplatos especiales, los cuales constan de celdas concéntricas, en donde se colocan los materiales de prueba para llevar a cabo la difusión gaseosa. La cantidad de bases volátiles absorbidas se determina por titulación. El amonio es determinado bajo el mismo procedimiento, adicionando formalina para que se desprenda el amonio en forma gaseosa. La TMA es estimada como la diferencia entre la

cantidad de BVT y el amonio. Las muestras se prepararon mediante la adición de 10% TCA, reportando los resultados en $\mu\text{mol N} / 100 \text{ g}$ de ensilaje.

ANALISIS DE DATOS

Los resultados de AFC, IFC y ASA se presentan y comparan en Figuras y Tablas, para su discusión. Los promedios de los datos obtenidos se presentan en el apéndice.

La cantidad de BVT es uno de los índices del estado de conservación de los productos marinos. En sus resultados, se observa que los valores se incrementan a partir del día 60, por lo que todos los análisis estadísticos se realizaron en los incrementos de cero a 60 días y de 60 a 90 días. Las variables que se analizaron con métodos estadísticos fueron: pH, BVT, porcentaje de líquido y proteína soluble, por ser éstos los parámetros que engloban las principales características de calidad en un ensilaje.

El pH y BVT se analizaron conjuntamente usando el análisis de varianza multivariado (MANOVA), de una vía para los incrementos de 60 días. Debido a que el pH mostró significancia estadística se uso la prueba *a posteriori* de Tukey, para observar las diferencias entre niveles con respecto a este parámetro (Morrison, 1976; Steel & Torrie, 1988). También se hicieron MANOVA en los incrementos de 60 a 90 días en estos mismos parámetros.

En lo que respecta a la cuantificación de proteína soluble y porcentaje de líquido, se decidió realizar el análisis para los mismos incrementos, a través de la prueba no

paramétrica de Kruskal Wallis, debido a que no presentó una homogeneidad de las varianzas en estas variables (Steel & Torrie, 1988)

V. RESULTADOS

1.- MATERIA PRIMA

El pescado que se utilizó como materia prima para la elaboración de los ensilajes ácidos, presentó características de frescura adecuadas para consumo humano.

Los resultados de los análisis del pescado crudo molido y molido precalentado se presentan en la Tabla II. Con excepción de los análisis de actividad enzimática, se observa que los demás resultados son similares, ya que las diferencias que hay entre sus valores son mínimas, no obstante, se pudo apreciar que el pescado molido precalentado a 60°C por espacio de cinco minutos, se decoloró y presentó la formación de agregados de carne. Por su parte, los resultados de los análisis de la actividad enzimática para el pescado crudo molido y molido precalentado, muestran valores de 33.0 y 4.7 mol Tyr eq /ml respectivamente.

Tabla II. Características iniciales de la materia prima. Pescado molido, crudo y precalentado antes de mezclar los ácidos

	Pescado crudo molido	Pescado molido precalentado
pH	6.1	6.2
% de líquido	1.0	1.0
Actividad enzimática	33.0 $\mu\text{mol Tyr eq /ml x h}$	4.7 $\mu\text{mol Tyr eq /ml x h}$
Proteína soluble	0.037 mg proteína /g de ensilaje	0.038 mg proteína /g de ensilaje
Aminoácidos libres	0.015 mg proteína /g de ensilaje	0.013 mg proteína /g de ensilaje
TMA	0.0	0.0

2.- ENSILAJES ACIDOS

TEMPERATURA Y pH

Al momento de adicionar los ácidos en los tratamientos AFC y ASA, se apreciaron cambios físicos, que consistieron en la decoloración y modificación textural del pescado crudo molido con el que se elaboraron estos ensilajes. En el tratamiento IFC ningún cambio apreciable se detectó, además de lo ya descrito, después del precalentamiento de la materia prima con la que fue elaborado. El promedio de las mediciones de pH de las replicas de los tratamientos y la temperatura ambiente a la cual se almacenaron se muestran en Tabla III.

En el empleo de los ácidos fosfórico y cítrico, la mezcla proporcionó un pH de 3.4 tanto en el pescado crudo molido como en el molido precalentado, que corresponden a los

tratamientos AFC e IFC, mientras que en el tratamiento ASA se registró un pH de 2.7, después de mezclarle los ácidos sulfúrico-acético.

Durante el tiempo de almacenamiento, se reportan los valores máximos de pH a los 90 días, con valores de 3.8, 3.6 y 3.2 para AFC, IFC y ASA respectivamente, indicando un incremento con respecto al inicio de 0.4 para AFC, 0.2 para IFC y de 0.5 para ASA. El ensilaje IFC fue el más estable, mientras ASA, fue el tratamiento que presentó menor estabilidad, además de que fue el más ácido.

Analizando las variaciones de pH para un tiempo de 60 días, se observó que el ensilaje ASA tiene un comportamiento diferente significativo a los otros dos ($p < 0.05$), observándose un valor de pH más bajo. Así mismo, las diferencias entre los incrementos de 60 a 90 días para este parámetro, no se detectaron diferencias significativas en los tres tratamientos ($p > 0.05$).

La temperatura ambiente a la que fueron almacenados los ensilajes, varió entre 23 y 35°C, donde la mayor temperatura que se registró corresponde al día 60 de elaborado el ensilaje, y la menor al tercer día (Tabla III).

Tabla III. Valores promedio de pH de los tratamientos AFC, IFC y ASA, y de la temperatura ambiente a la cual fueron almacenados

DIA	AFC pH	Sn	IFC pH	Sn	ASA pH	Sn	T C°
0	3.40	0.00	3.40	0.00	2.70	0.00	24
1	3.31	0.05	3.23	0.04	2.51	0.11	24
2	3.43	0.07	3.31	0.02	2.62	0.13	24
3	3.50	0.07	3.36	0.04	2.66	0.12	23
5	3.53	0.08	3.36	0.02	2.68	0.11	24
7	3.55	0.08	3.37	0.03	2.71	0.12	24
9	3.53	0.09	3.34	0.03	2.70	0.13	24
15	3.65	0.11	3.54	0.04	2.56	0.36	26
20	3.94	0.06	3.69	0.04	3.15	0.05	27
25	3.73	0.12	3.61	0.16	3.40	0.08	29
30	4.18	0.08	3.79	0.04	3.41	0.09	29
40	3.99	0.08	3.60	0.10	3.09	0.08	30
50	3.80	0.03	3.60	0.02	3.11	0.09	33
60	3.78	0.07	3.57	0.01	3.10	0.12	35
90	3.80	0.08	3.60	0.02	3.20	0.07	33

PORCENTAJE DE LIQUIDO

El comportamiento de los ensilajes con respecto a la cantidad de líquido presente en cada uno de ellos durante su tiempo de almacenamiento, se presenta en la Figura 2.

Los tratamientos AFC y ASA presentan la tendencia a aumentar el porcentaje de líquido conforme transcurre el tiempo de almacenamiento. En ambos ensilajes el valor mínimo corresponde al día cero con 24.26% y 47.87% respectivamente, y el valor máximo al día 90 con 65.07 % y 59.50% respectivamente (ver apéndice, Tabla IV). Se observa que se logra una estabilidad del porcentaje de líquido en los dos tratamientos, entre los días 20 y 25 de almacenamiento (Figura 2).

En el tratamiento IFC el porcentaje de líquido se mantuvo constante, con valores que fluctúan entre 41.17 y 45.71%, correspondiendo al inicio y final del tiempo de almacenamiento respectivamente (ver apéndice, Tabla IV).

Con lo que respecta al incremento para 60 días, se observó que hay diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$), de tal forma que IFC posee una suma de rangos menor que las de AFC y ASA, es decir, que sus valores son más bajos que los de los otros tratamientos. En el incremento de 60 a 90 días, se observan diferencias significativas ($p < 0.05$), donde AFC posee los valores más altos.

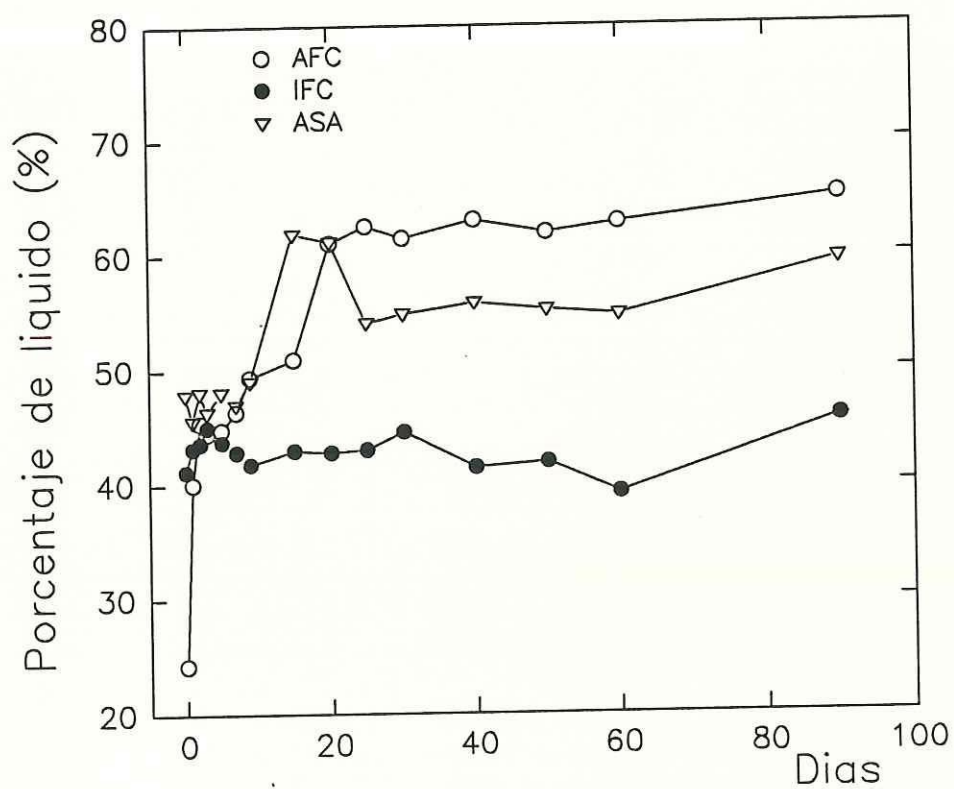


Figura 2. Valor promedio del porcentaje de liquido en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante su almacenamiento.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

En la Figura 3 se presentan las curvas que describen los valores promedio de la actividad enzimática para AFC, IFC y ASA, durante el tiempo de muestreo.

Se aprecia que las curvas de actividad enzimática de AFC y ASA, muestran tendencias similares, a disminuir conforme transcurre el tiempo de almacenamiento de los ensilajes. En IFC se observan valores muy bajos de actividad desde el inicio, en comparación con los otros dos tratamientos, estos valores se mantienen constantes durante todo el tiempo de muestreo (Figura 3).

La actividad enzimática fue mayor para los tratamientos AFC y ASA, que corresponden a los tratamientos crudos, cuyos valores promedio, del inicio al final del tiempo de muestreo, varían de 26.12 a 23.30 y de 30.67 a 15.91 $\mu\text{mol Tyr eq /ml x h}$, respectivamente. El tratamiento IFC, o sea, el tratamiento precalentado, presenta una actividad enzimática de 2.7 a 0.21 $\mu\text{mol Tyr eq /ml x h}$, para el inicio y el final del muestreo respectivamente (ver apéndice, Tabla V).

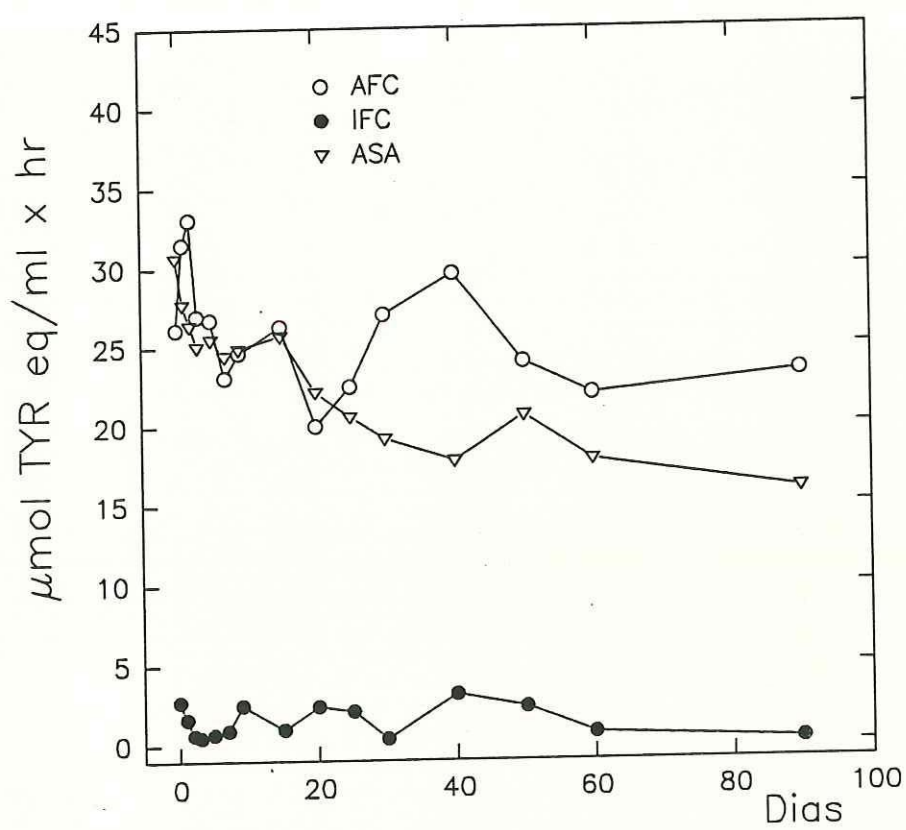


Figura 3. Actividad enzimática de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada como $\mu\text{mol TYR eq /ml} \times \text{h}$, utilizando hemoglobina como sustrato.

PROTEINA SOLUBLE

En la Figura 4, se muestra la gráfica con los resultados promedio de la cantidad de proteína soluble presente en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante el tiempo de muestreo.

El contenido de proteína soluble en el pescado crudo molido varió de 0.037 a 8.58 mg de proteína /g al elaborar el ensilaje AFC, así como de 0.037 a 17.34 mg de proteína /g en la elaboración del tratamiento ASA. También se observaron cambios de proteína soluble en la elaboración de IFC, ya que el pescado molido precalentado presentó valores de 0.038, que aumentaron a 14.45 mg de proteína /g después de elaborado este tratamiento (ver apéndice, Tabla VI).

En 60 días, la diferencia entre tratamientos fue significativa ($p < 0.05$), en donde las sumas de rangos de AFC y ASA respectivamente, presentan valores mayores a los observados para IFC, es decir, los valores de cantidad de proteína soluble en IFC son menopsres. Se observa, quie los tratamientos AFC y ASA tienden a aumentar la cantidad de proteína soluble durante los primeros 20 y 15 días respectivamente, tiempo en el que se estabilizan los valores, manteniéndose constantes durante el resto del muestreo (Figura 4).

Existen diferencias significativas entre tratamientos, en los incrementos de proteína soluble registrados en los días 60 al 90 ($p < 0.05$). Se observa que el tratamiento IFC posee los incrementos más bajos con respecto a este parámetro, ya que el tratamiento AFC muestra una variación de 8.58 mg de proteína /g de ensilaje, el cual corresponde al

día cero, a 22.10 mg de proteína /g de ensilaje, el día 90 de muestreo, y un valor máximo de 22.49 mg de proteína /g de ensilaje registrado durante el día 20. Para el ensilaje ASA, el valor mínimo corresponde al tercer día y el máximo al día 90 con 17.11 y 25.59 mg de proteína /g de ensilaje respectivamente, mientras que los valores en el tratamiento IFC, oscilaron durante todo el muestreo, entre 14.45 y 17.81 mg de proteína /g de ensilaje, con una cantidad promedio de 15.35 mg de proteína /g de ensilaje (Tabla VI).

AMINOACIDOS LIBRES

Las curvas de la Figura 5, muestran el comportamiento de los valores promedio de la cantidad de aminoácidos libres presentes en los diferentes tratamientos, durante el tiempo de muestreo.

La cantidad de aminoácidos libres presente en el pescado crudo molido (0.015 mg de proteína /g), se modificó después de la adición de los ácidos al elaborar los tratamientos AFC y ASA, obteniéndose los valores de 0.70 y 1.17 mg de proteína /g, respectivamente.

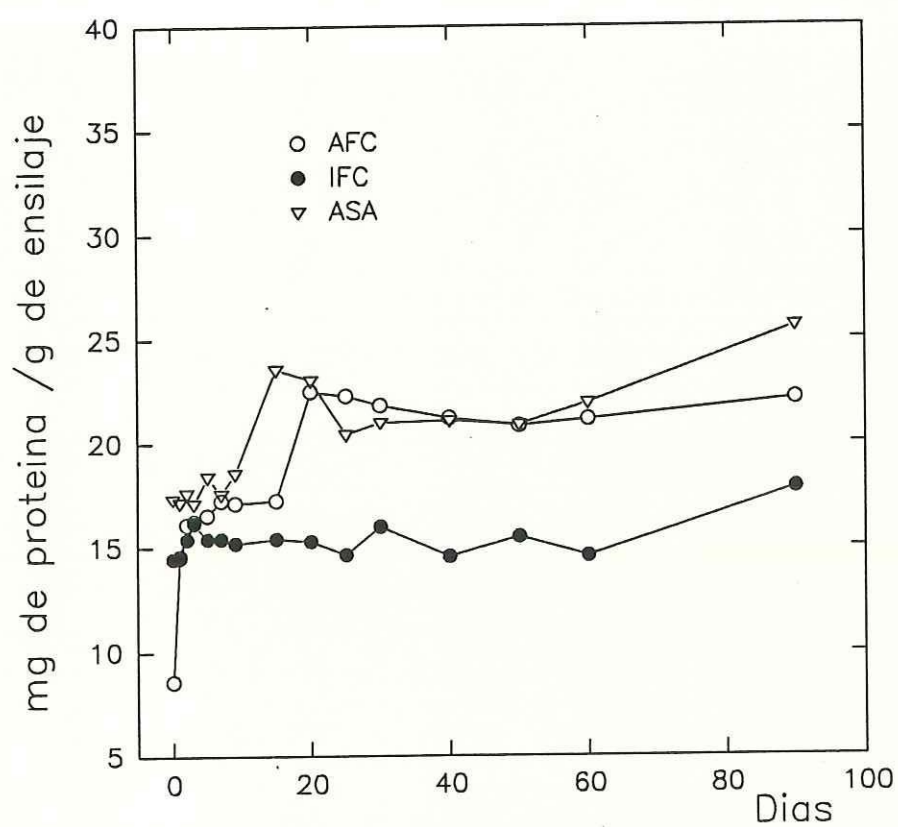


Figura 4. Proteína soluble en los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en mg de proteína /g de ensilaje.

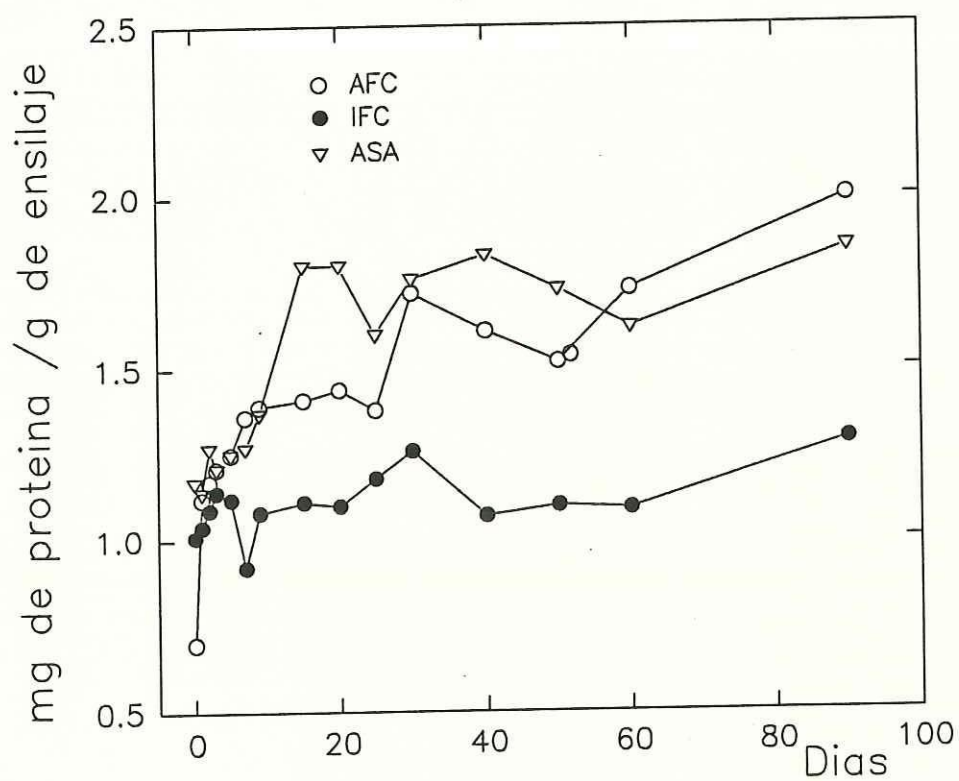


Figura 5. Cantidad de aminoácidos libres en los ratamientos, AFC, IFC y ASA dada en mg de proteína /g de ensilaje.

Así como en el tratamiento **IFC**, en donde el valor del pescado molido precalentado fue de 0.013 y de 1.01 mg de proteína /g de ensilaje después de añadir los ácidos para la elaboración de este tratamiento (Tabla II y apéndice Tabla VII).

Los ensilajes **AFC** y **ASA** presentan tendencias semejantes a aumentar durante todo el proceso de muestreo (Figura 5). El tratamiento **AFC** muestra valores de 0.69 y de 1.99 mg de proteína /g de ensilaje, para el día cero y 90, respectivamente, mientras que **ASA** presenta un incremento en sus valores, que va de 1.17 a 1.85 mg de proteína /g de ensilaje, entre el día cero y 90. La cantidad de aminoácidos libres en **IFC** oscila entre 0.92 y 1.28 mg de proteína /g de ensilaje, con un valor promedio de 1.10 mg de proteína /g de ensilaje, durante el proceso de muestreo (ver apéndice, Tabla VII).

BASES VOLATILES TOTALES

En la Figura 6 se presentan las curvas que describen los resultados promedio de la cantidad de BVT determinada en las réplicas de los ensilajes **AFC**, **IFC** y **ASA**, dada en $\mu\text{mol N} / 100 \text{ g}$ de ensilaje, durante el tiempo de muestreo.

El análisis estadístico para el incremento de BVT en 60 días, reportó que no existen diferencias entre los tratamientos ($p > 0.05$). Se observa que el ensilaje **AFC** se mantiene con un incremento constante durante 50 días, con una cantidad que va de 52.00 a 103.00 $\mu\text{mol N} / 100 \text{ g}$ de ensilaje, posteriormente sufre un mayor incremento entre los días 50 y 90, y alcanza 223.33 $\mu\text{mol N} / 100 \text{ g}$ de ensilaje. El ensilaje **IFC** presenta un

comportamiento constante durante 60 días con un promedio de $80.23 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje, incrementándose durante los últimos treinta días del estudio, alcanzando $243.33 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje. Los resultados de los análisis del ensilaje ASA muestran que este ensilaje tuvo la tendencia a incrementar las BVT, ya que presenta valores que van de 54.67 a $96.00 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje, para el día cero y el día 60 respectivamente, y llega a alcanzar el día 90 el valor de $246.67 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje (ver apéndice, Tabla VII). Entre los incrementos de 60 a 90 días para este parámetro, el resultado fue el mismo ($p > 0.05$).

TRIMETILAMINA

La gráfica de los valores promedio de la cantidad de trimetilamina encontrada en los ensilajes AFC, IFC y ASA, durante el tiempo de muestreo, se presentan en la Figura 7.

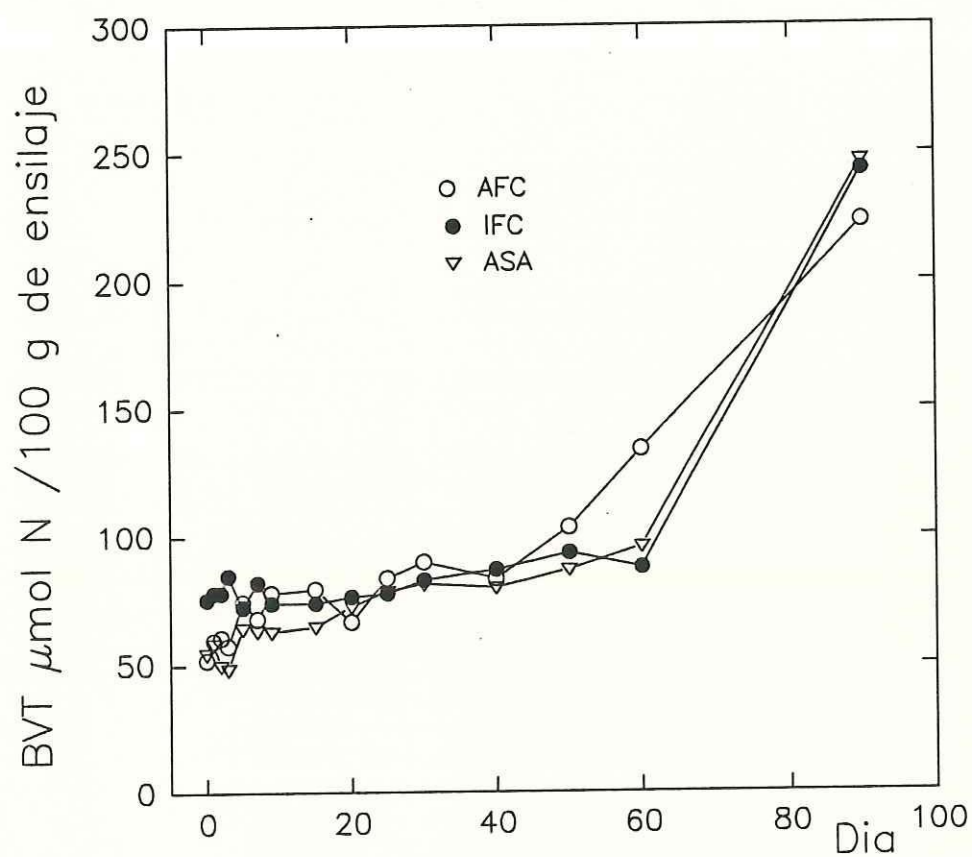


Figura 6. Bases volátiles totales (BVT) en los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.

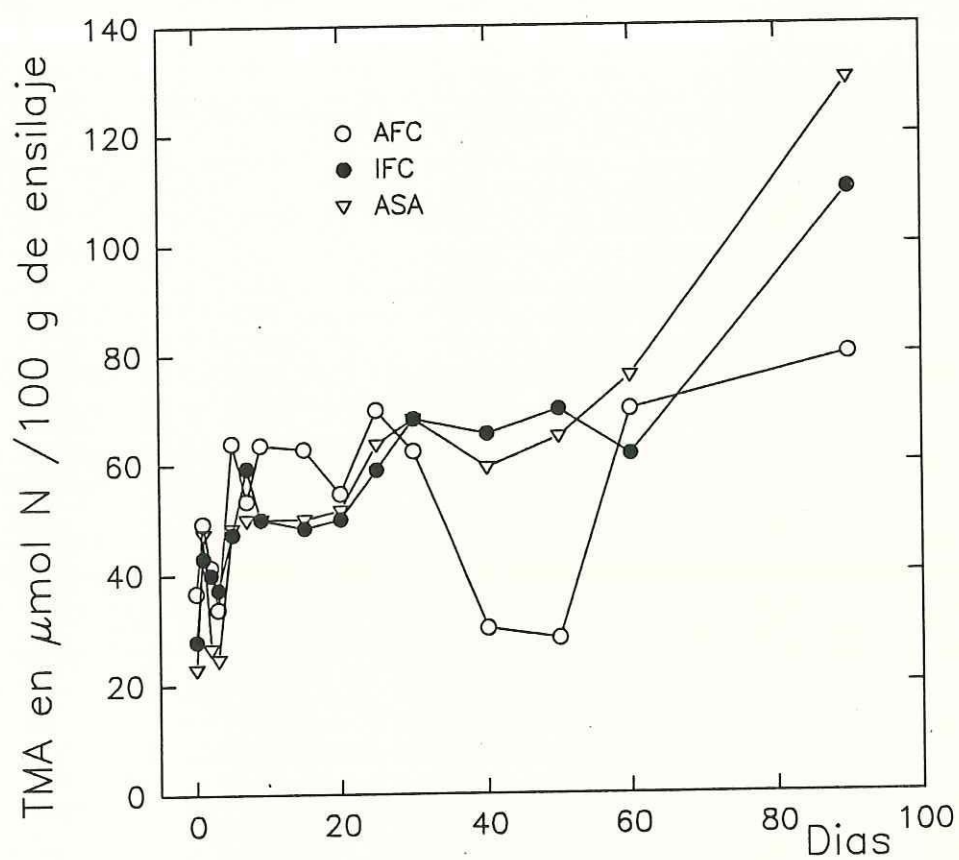


Figura 7. Cantidad de trimetilamina (TMA) en los ensilajes AFC, IFC Y ASA, dada en μmol de N /100 g de ensilaje.

En general, se observa la tendencia a aumentar la cantidad de trimetilamina conforme pasa el tiempo de almacenamiento. Para **AFC** el valor mínimo corresponde al día cero con $36.67 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje, y el valor máximo al día 90 con $80.00 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje. En el tratamiento **IFC** el valor mínimo correspondió al día cero, con $28.00 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje, y el máximo al día 90 con $110 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje. De igual manera sucede con el ensilaje **ASA** con un valor mínimo de $23.00 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje el día cero, y un valor máximo de $130 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje, para el día 90 (ver apéndice, Tabla IX).

AMONIO

Las curvas de la Figura 8 corresponden a los promedios de la cantidad de amonio presente en los tratamientos **AFC**, **IFC** y **ASA** durante su muestreo.

En el ensilaje **AFC** se observa que la concentración de amonio se mantuvo constante con $15.00 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje hasta el día 25, posteriormente se observa un incremento en la concentración a partir del día 30 y alcanza a tener $126.67 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje el día 90. El ensilaje **IFC** mantiene constante la cantidad de amonio hasta el día 60 con la cantidad de $28.10 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje. Se observa un incremento en la concentración el día 90 que alcanza $133.33 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje. En el ensilaje **ASA** se mantuvo constante la concentración de amonio con valores de $18.40 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje hasta el día 60 y alcanzó el valor de $116.67 \mu\text{mol N}/100 \text{ g}$ de ensilaje el día 90 (ver apéndice, Tabla X).

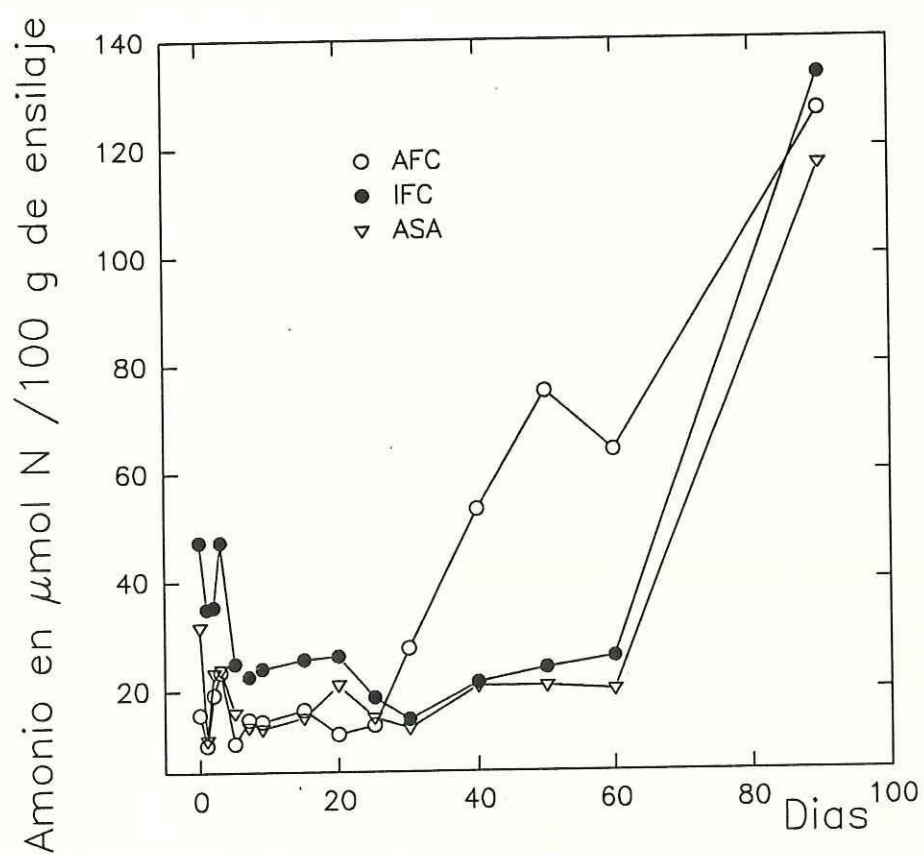


Figura 8. Cantidad de amonio en los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N} / 100 \text{ g}$ de ensilaje..

VI. DISCUSIONES

Los resultados de los análisis de los tres tratamientos de ensilajes ácidos de pescado reflejan los cambios físicos y bioquímicos que ocurrieron durante su elaboración y almacenamiento, así como su estado de conservación. Con el objeto de establecer las diferencias que existen entre ellos, se discuten cada uno de los análisis por separado.

VI.1. MATERIA PRIMA

El pescado macarela (*Scomber japonicus*) que fue utilizado como materia prima para la elaboración de los tres tratamientos de ensilajes ácidos de pescado, es uno de los principales productos pesqueros en la región, que se utiliza en la producción de alimento animal (Figura. 1), por lo cual se decidió a observar su comportamiento como ensilaje. El motivo de haber utilizado el pescado entero y no subproductos de éste fue para estandarizar la materia prima. La macarela es un pez graso cuyos lípidos no son favorables en la elaboración de ensilajes (Gildberg, 1982), ya que pueden oxidarse formando compuestos carbonílicos dañinos para la alimentación de cualquier organismo (Addis, 1986). No obstante, el contenido de lípidos en un ensilaje no es una limitante, ya que estos pueden ser extraídos antes o después de su elaboración sin causar ningún daño en la alimentación animal (Raa *et al*, 1983), por lo que el pescado macarela, como cualquier otro pez graso, puede ser utilizado en la elaboración de ensilajes.

Las modificaciones *post mortem* que sufre el pescado, son muy complejas y no se pueden representar en un solo esquema. En general, se observa que después de la muerte se verifica una anaerobiosis y se produce ácido láctico como producto intermedio, (ésto origina un descenso del pH del músculo), que posteriormente se oxida; paralelamente, las bacterias reducen el óxido de trimetilamina que se encuentre presente en la carne, transformándolo a trimetilamina (Pérez-Salmerón, 1985). Por lo anterior se deduce que la actividad enzimática y bacteriana producen un cambio en la concentración de los iones hidrógeno, que puede determinarse midiendo el pH. Los resultados de las mediciones de pH y de la cantidad de trimetilamina, demostraron que la materia prima, pescado crudo molido, no presentó deterioro por actividad bacteriana (Tabla II), ya que el pH tuvo un valor ligeramente ácido, y no hubo presencia de bases volátiles totales, que es un índice de frescura en productos pesqueros (Neave, 1986).

Es importante que la materia prima con la que se elabora el ensilaje se encuentre en buen estado, ya que el ensilaje podrá conservar las características del pescado, más no mejorarlas, no obstante se ha observado que el pescado muy fresco al adicionarle los ácidos, genera agregados protéicos en los cuales no penetra el ácido y posteriormente se descomponen (Raa & Gildberg, 1982). Por otra parte, al moler el pescado se generó un tamaño de partícula de 0.5 cm, ya que partículas mucho mayores, al no poder mezclarse homogéneamente con los ácidos, pueden quedar con un pH más alto en su interior, lo que puede reducir la calidad del ensilaje. En caso contrario, cuando el pescado se encuentra muy molido, al ponerse en contacto con el ácido, se pueden formar agregados de tejido, impidiendo la penetración del ácido, con la obtención de una preservación pobre con un posible deterioro posterior del producto (Gildberg, 1982).

La evaluación de la actividad enzimática para el pescado crudo molido fue alta con respecto a los valores del pescado molido precalentado. Estas diferencias pueden ser atribuidas al proceso de inactivación de las enzimas, debido al precalentamiento (Tabla II). Cabe aclarar que la actividad enzimática está dada de acuerdo al porcentaje de líquido. En este caso, la materia prima tenía un 1% de líquido y por lo tanto dicha actividad es un reflejo de las enzimas liberadas en el 1% líquido del producto, sin embargo Gildberg (1982), propone que durante los tres primeros días de elaborado un ensilaje, se encuentran enzimas atrapadas en el tejido, que posteriormente se irán liberando.

La baja cantidad de proteína soluble y de aminoácidos libres en el pescado crudo molido (Tabla II), demuestran un bajo grado de autólisis, lo que indicó que las enzimas aún no llevaban a cabo un proceso generalizado de hidrolización de proteínas. De igual manera en el pescado molido precalentado, la baja cantidad de proteína soluble y aminoácidos libres, demuestran que el precalentamiento del pescado a 60°C durante cinco minutos, no influyó en la hidrolización de las proteínas, no obstante, se ha encontrado, que a esa temperatura ocurre un proceso parcial de desnaturalización protéica (Sikorski *et al*, 1984; Chan, *et al*, 1992).

Tanto el pescado crudo molido, como el pescado molido precalentado, presentaron un porcentaje de líquido muy bajo, con la observación de que el pescado entero presentó mayor escurrimiento de líquidos que el de los dos estadios de la materia prima, debido tal vez a que en estos últimos se encontraban agregados protéicos que impidieron el escurrimiento en ambos estadios, de acuerdo con Oreskovich *et al.*, (1992).

VI. 2. ENSILAJES

VI. 2. 1. pH y TEMPERATURA

La adición de los ácidos es el factor principal para obtener ensilajes estables (Raa *et al*, 1983). De acuerdo con Raa y Gildberg (1982) y Hansen (1981) cuando no se logra una mezcla suficientemente homogénea da lugar a microambientes extremos, es decir, zonas donde hay pHs muy altos y otras donde están muy bajos. El pH registrado en los tres tratamientos (Tabla III) muestra que hubo una buena homogeneización de los ácidos en todos los ensilajes, ya que durante 90 días de muestreo éstos sufrieron variaciones mínimas dentro de los valores aceptados de pH, de acuerdo con Raa y Gildberg (1982). El pH es el indicador primario de un proceso de descomposición, ya que cuando existe contaminación por microorganismos hay una tendencia a aumentar, no obstante, un ligero aumento en el pH no necesariamente indica un deterioramiento por microorganismos, ya que existen procesos químicos y/o bioquímicos de desaminación produciendo la liberación de amonio y por ende, afectando el pH (Gildberg, 1982).

El análisis de varianza y las pruebas *a posteriori* que se realizaron en los valores de pH de los tres tratamientos, indican que hay diferencias significativas entre los tratamientos AFC con ASA, e IFC con ASA ($p < 0.05$). En este sentido, es posible concluir que el tratamiento IFC fue el más estable, mientras que el ensilaje ASA, fue el que más cambios presentó, además de ser el ensilaje más ácido (Tabla III). La acidéz del tratamiento ASA se debe a que se siguió el método tradicional, recomendado por varios autores (Hansen,

1981; Gildberg, 1982 y Raa *et al*, 1983), el cual, requiere de alcanzar pH muy ácido, para que la mezcla posea cualidades de preservación efectivas.

La aplicación de calor (precalentamiento) en la materia prima, además de servir para inactivar a las enzimas endógenas del pescado, induce a grandes cambios estructurales en las fibras de proteína, provocando una desnaturalización fibrilar (Chan, *et al*, 1992). De esta manera, podemos asegurar que el tratamiento IFC sufrió, desde el inicio, un doble proceso de cambio estructural en sus fibras de proteína, tanto por el pH inicial, como por el precalentamiento a 60°C, al que fue sometida la materia prima con la que se elaboró.

VI. 2.2. PORCENTAJE DE LIQUIDO Y ACTIVIDAD ENZIMATICA

La producción de agua en los ensilajes se debe principalmente a la liberación de ésta de los tejidos, y refleja el grado de hidrólisis ocurrido (Gildberg, 1982). Los factores responsables de dicha hidrólisis son las enzimas endógenas del pescado y el pH obtenido a consecuencia de los ácidos añadidos. Si bien el primer factor es considerado como el factor principal de licuación (Backhoff, 1976; Gildberg, 1982; Raa *et al*, 1983), el pH es también de suma importancia (Raa, 1980). Se sabe que una carne sometida a pH bajo tiene mayor pérdida de agua que a pHs neutrales (Daum-Thunberg *et al*, 1992), y también que un pH mínimo de 3.25 es capaz de cambiar las propiedades texturales de las proteínas musculares, debido a la polimerización de sus fibras, causando un mayor enlazamiento de agua (Oreskovich *et al*, 1992). En los tratamientos con fosfórico-cítrico (AFC y IFC) los pHs iniciales fueron mayores que en el tratamiento con sulfúrico-acético (ASA), en donde se observó un mayor porcentaje de líquido inicial que en los

otros (Figura 2), lo que coincide con las observaciones de Daum-Thunberg *et al* (1992), y con Oreskovich *et al* (1992). Sin embargo, durante el transcurso del almacenamiento el incremento en el porcentaje de líquido en AFC, fue mayor que el de ASA (Figura 2). Este patrón de inversión en el porcentaje de líquidos de ambos tratamientos, depende aparentemente, de la adición de los ácidos, sin embargo, la actividad enzimática debe tener también un papel fundamental (Backhoff, 1976). A un pH de 3.4, proporcionado por los ácidos fosfórico-cítrico, el proceso de licuación quizás esté dado por la actividad enzimática, más que por la acidez de la mezcla de los ácidos. Las enzimas más activas en condiciones ácidas son las proteasas digestivas del tipo de la pepsina, así como ciertas enzimas lisosomales como la catepsina D (Gildberg, 1982). La pepsina presenta un pH óptimo entre 3 y 4 cuando se utiliza hemoglobina como substrato, mientras que en el pescado la tasa óptima de autólisis es a pH 4 (Raa & Gildberg, 1982). De acuerdo con lo anterior, un pH de 3.4 a 3.8 (inicial y final de AFC respectivamente) favoreció la tasa de autólisis, mientras que en ASA, en donde el pH se encontraba más bajo, la actividad enzimática debió ser menor (Tabla III).

Al inicio, el pescado precalentado destinado a IFC mostró un porcentaje de líquido del 1%, en forma similar al crudo; sin embargo, al adicionar los ácidos fosfórico-cítrico, en IFC hubo un cambio mayor en el porcentaje de líquido (de 1 a 41.17%), que en AFC (de 1 a 24.26%). Esta diferencia entre los dos tratamientos pudo deberse al precalentamiento que la materia prima sufrió para el tratamiento IFC. Las fibras de proteínas al ser expuestas al calor, sufren un proceso de gelatinificación, lo cual conlleva a un enlazamiento de agua (Chan *et al*, 1992). De esta manera, se explica porque no hubo aumento en el porcentaje de líquido inmediatamente después de haber sometido el pescado al precalentamiento. Por otro lado, el pH influye directamente en la liberación

de agua de los tejidos (Daum-Thunberg *et al*, 1992), por lo que al mezclar los ácidos se reflejó el grado de desnaturalización que la proteína sufrió por efecto del precalentamiento en IFC, y por lo tanto se observó mayor porcentaje de líquido en AFC.

El tratamiento IFC, en general, no mostró cambios grandes durante el transcurso de almacenamiento en todos los parámetros analizados, a diferencia de AFC y ASA. La causa de dicha estabilidad puede ser atribuida a que la actividad enzimática se redujo casi en su totalidad (Figura 3), a consecuencia del precalentamiento, ya que las enzimas son las causantes principales de la hidrólisis de las proteínas en los ensilajes (Backoff, 1976; Hansen, 1981; Gildberg, 1982; Raa & Gildberg, 1982; Raa *et al*, 1983).

VI. 2.3 PROTEINA SOLUBLE Y AMINOACIDOS LIBRES

La concentración de proteína soluble es un reflejo de la actividad enzimática y en general del grado de desnaturalización que sufrieron las proteínas durante el proceso y almacenamiento de los ensilajes (Backoff, 1976; Raa & Gildberg, 1982; Hardy *et al*, 1983; Stone *et al*, 1989). Cerca del 80% de las proteínas se solubilizan después de una semana a temperatura ambiente (Tatterson & Windsor, 1973). Sin embargo, esto varía debido a la diferente composición de la piel y el músculo, ya que la tasa de solubilización de las proteínas, depende del pH al que se encuentren: p. ej. a pH 4 la piel se solubiliza más rápido que a pH 7, mientras que a ese pH el músculo se contrae y se degrada más lentamente (Raa, 1980). En los tratamientos AFC y ASA (Figura 4) se observa que la solubilización de las proteínas cesa entre los 15 y 20 días de ensilado, a una temperatura promedio de 24°C (Tabla III). Este resultado no corresponde a lo observado por

Backhoff (1976), que encontró, que la solubilización de las proteínas en un ensilaje, cesa antes de dos semanas de almacenamiento, a una temperatura de 21°C. No obstante, existen factores, como un alto contenido de lípidos, que pueden reducir la solubilización de éstas (Raa & Gildberg, 1982), lo cual pudo haber ocurrido en el presente trabajo, ya que los ensilajes se elaboraron con macarela que es un pez graso, por lo tanto poseen un alto contenido de lípidos (Pérez-Salmerón, 1985).

Por otra parte, existen diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p < 0.05$), siendo **IFC** el que presenta los valores más bajos, ya que su concentración final de proteína soluble corresponde a lo registrado en el tiempo cero en **ASA** y al día 7 en **AFC**, así como, en la cantidad de aminoácidos libres se observan comportamientos similares (Figuras 4 y 5). Por lo anterior es posible suponer que el proceso de calentamiento, al lograr una reducción en la actividad enzimática, dio como resultado una menor concentración de proteína soluble y aminoácidos libres, lo cual implica una menor hidrolización de las proteínas presentes en el ensilaje. Por lo tanto **IFC**, de acuerdo a este criterio, es el mejor tratamiento.

VI.2.4 BASES VOLATILES TOTALES (BVT), TRIMETILAMINA (TMA) Y AMONIO

Los resultados de bases volátiles totales (BVT) trimetilamina (TMA) y amonio, se discuten en conjunto, ya que los resultados provienen de un mismo análisis. Dependiendo del tipo de producto pesquero que se trate la concentración de TMA o de amonio varia. De esta manera, un pez de agua dulce producirá cantidades mayores de amonio como

producto de descomposición, un pez cartilaginoso desarrollará urea en mayor proporción y un pez óseo marino, TMA (Zaitsev *et al*, 1969). Por ser la macarela un pez óseo la cantidad de TMA es mayor que la de amonio en todos los tratamientos (Figuras 7 y 8).

La macarela *Scomber japonicus* presenta una cantidad variable de óxido de trimetilamina (TMAO) en las diferentes partes del cuerpo, desde 12.88 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ en el músculo, hasta 1,694.92 en el hígado (Hebert *et al*, 1982). Se dice (Raa *et al*, 1983) que la TMA es producida exclusivamente por bacterias debido a la reducción del TMAO. Por otro lado Haaland y Njaa (1989) establecen que un ensilaje de pescado bien preservado no debe dar lugar a la producción de TMA. En todos los tratamientos experimentales no se observaron cambios en el pH (Tabla II), lo cual no da un indicio de crecimiento bacteriano, sin embargo la cantidad de TMA se incrementó en los tres tratamientos a partir del día 60 (Figura 7 y apéndice, Tabla VIII). Si bien los valores finales se incrementaron en los últimos 30 días de almacenamiento, éstos no alcanzan los límites considerados como no aptos para el consumo humano, los cuales se establecen en 1,428.57 $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de pescado (Pearson, 1971).

Por otra parte, en los ensilajes ácidos, las proteínas se hidrolízan dando lugar a péptidos y aminoácidos libres, los cuales se mantienen estables aún después de largos períodos de almacenamiento a temperatura ambiente (20°C), (Raa *et al*, 1983). Sin embargo, debido a descomposición química, o a descomposición catalizada por enzimas, éstos pueden ser degradados hasta producir la formación de amonio (Stone & Hardy, 1986); en donde, la degradación de aminoácidos, algunos esenciales para la mayoría de los organismos, como la histidina y el triptofano, además de que no se encuentren disponibles en el alimento, pueden encontrarse formando moléculas complejas que en algunos casos, como en las

harinas de pescado, son tóxicas (Osuna, 1985). En el presente trabajo se encontró que los aminoácidos se mantuvieron estables durante 90 días en los tres tratamientos (Figura 5), sin embargo, las curvas de los promedios de amonio en los tres ensilajes muestran tendencia a aumentar drásticamente a partir del día 60, hasta terminar con niveles de amonio altos el día 90 (Figura 8).

El análisis químico hace suponer que existen diferencias en la cantidad de BVT, entre los tres ensilajes. Sin embargo, debido a la gran variabilidad presentada entre ellos, para un tamaño de muestra de 3, esta diferencia pudo ser encubierta, por lo que no fue posible concluir que existen dichas diferencias. Con base en esta discusión, se puede decir que existe una baja potencia de prueba en la estadística de los resultados (altos valores de probabilidad de cometer el error tipo II). La gran variabilidad presentada, es seguramente un reflejo del inicio de un proceso de descomposición, donde la tasa de formación de BVT, incluyendo TMA y amonio, se incrementa a diferente velocidad, aún entre las mismas réplicas de los tres tratamientos. Por tal motivo, será necesario observar más cuidadosamente la conservación de un ensilaje de este tipo, después de 60 días.

La temperatura juega un papel importante en la conservación de los ensilajes, acelerando el proceso de licuación. Si bien, un ensilaje puede permanecer estable hasta 2 años en condiciones de temperatura ambiente (20°C), a temperaturas tropicales se reporta un tiempo anaquel menor (Raa *et al*, 1983). En el presente trabajo, los ensilajes fueron almacenados en el laboratorio, donde la temperatura ambiente alcanzó niveles altos a partir del día 40 (30°C), siendo máximo el día 60 (35°C) (Tabla II). Aún si los niveles obtenidos de BVT en el presente trabajo, no indican descomposición, su aumento a partir del día 60, puede ser atribuido a la alta temperatura registrada (Raa *et al*, 1983), y no a la

actividad bacteriana, ya que el pH se mantuvo estable. De cualquier manera, el aumento de amonio en los ensilajes producto de un proceso de desaminación, trae como consecuencia una disminución en el nitrógeno protéico, y por ende, una disminución en el valor nutricional, por lo que se recomienda que se vigile la temperatura de almacenamiento para mantener su valor alimenticio.

VII CONCLUSIONES

En el presente trabajo se puede concluir que los ensilajes de pescado son una alternativa a la conservación de los subproductos pesqueros. También se concluye que al realizar un precalentamiento antes del proceso de ensilaje, se logra una mejor conservación del producto.

De los tratamientos realizados puede decirse lo siguiente:

1. La materia prima precalentada del tratamiento **IFC** ocasionó la reducción de la actividad enzimática, la cual se reflejó en un menor porcentaje de líquido, donde se obtuvo 15% menos que en el ensilaje convencional **ASA** y 20% menos que en **AFC**. A su vez, este nivel en el porcentaje de líquido, o sea hidrólisis, se vio reflejado en una menor cantidad de proteína soluble y aminoácidos libres. Esto último sugiere que el producto tiene mejor valor nutricional.
2. La mezcla de los ácidos fósfórico y cítrico tiene la ventaja de que el ácido cítrico, al estar en estado sólido su manejo presente menor riesgo. Sin embargo, cuando éstos son utilizados sobre pescado crudo pueden tender a una homogeneización pobre, lo cual lleva a una menor estabilidad. Por lo tanto, su empleo se recomienda para materia prima precalentada, o bien, aplicarlo en forma diluída, en la menor cantidad de agua posible, quizá favorezca su homogeneización.

3. Cuando se utiliza materia prima cruda, la mezcla de ácidos sulfúrico-acético proporciona mejores resultados que la mezcla de ácidos fosfórico-cítrico, ya que se apreció mayor estabilidad en el tratamiento ASA que en AFC, bajo las condiciones experimentales de este trabajo.
4. La temperatura de almacenamiento de los ensilajes debe ser controlada, ya que el aumento de la temperatura reduce la calidad nutricional al generarse amonio a partir de la desaminación de los aminoácidos.

Se propone el ensilaje precalentado como un método de conservación para el aprovechamiento de los subproductos pesqueros de la región, lo cual dará lugar a la generación de alimento para la acuicultura y animales domésticos. Los subproductos pesqueros regionales que no puedan ser destinados a su reducción a harina de pescado, podrían ser ensilados, y por lo tanto, disminuir una de las causas más importantes de contaminación provocada por los desechos de las industrias pesqueras.

BIBLIOGRAFIA

Addis, P.B. (1986) Occurrence of Lipid Oxidation Products in Foods. *Food and Chemical Toxicology*. 24(10/11):1021-1030.

Anuario estadístico de pesca en 1989 (1991) Secretaría de Pesca, Dirección General de Informática y Registro Pesqueros. México. 125 p.

Åsgård, T. & Austreng, E. (1986) Blood ensiled or frozen, a feed for salmonids. *Aquaculture*. 55: 263-284.

Backhoff, H. P. (1976) Some chemical changes in fish silage. *J. Fd. Technol.* 11: 353-363.

Chan, J. K.; Gill, T. A. & Paulson, A. T. (1992) Cross-linking of Myosin Heavy Chains from Cod, Herring and Silver Hake During Thermal Setting. *Journal of Food Science*. 57(4):906-912

Conway, E. J. & Byrne, A. (1933) LXI. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances. 1. The micro-determination of ammonia. *Biochem. J.* 27: 419-429.

Cook, D. (1984) Silage from the sea. *Marine resource Bulletin a Sea Grant advisory Service*. XVI(1):5-7.

Daum-Thunberg, D. L.; Foegeding, E. A. & Ball Jr., H. R. (1992) Rheological and Water-Holding Properties of Comminuted Turkey Breast and Thigh: Effects of Initial pH. *Journal of Food Science*. 57(2):333-337.

Departaments of food science and meat and animal science. (1976) Handling fishery wastes and by-products. Fish liquifaction. University of Wisconsin-Extension. 25 p.

Gildberg, A. (1982) Autolysis of fish tissue - General aspects. *Thesis* for the degree of Doctor scientiarum. Tromsø, Norway.

Haaland, H. & Njaa, L.R. (1989) Total Volatile Nitrogen- a Quality Criterion for Fish Silage? *Aquaculture*. 79:311-316.

Hansen, F.R. (1981) Ensilert Rekeavfall som fôr til Laksefisk og som råstoff til Kitosanproduksjon. *Kandidatoppgave i Fiskerifag*. Norgesfiskerihøgskole/Universitetet i Tromsø, Norge. 75 p.

Hardy, R.W.; Shearer, K.D.; Stone, F.E.; & Wieg, D.H. (1983) Fish silage in aquaculture diets. *J. World Mariculture Soc.* 14: 695-703.

Hebard, C. E.; Flick, G. J. & Martin, R. E. (1982) Occurrence and Significance of Trimethylamine Oxide and Its Derivatives in Fish and Shellfish. *En: Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products*. (Martin, R. E.; Flick, G. J.; Ward, D. R. ed.) AVI Publishing Company. 149-189.

Lowry, O.U.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randal, P.J. (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

Martin, R. E.; Flick, G. J.; & Ward, D. R. (1982) *En: Chemistry & Biochemistry of Marine Food Products.* AVI Publishing Company. 222-223.

Moctezuma-Hernández, P. & Alvarez-López, J. (1989) Estructura y funcionamiento de la Industria Pesquera. *En: La Pesca en Baja California.* (Siri, M.; Moctezuma-Hernández, P ed.) Universidad Autónoma de Baja California: 129-143.

Morrison, D. F. (1976). *En: Multivariate Statistical Methods.* 2^a ed. McGraw-Hill Int. Book Co. 415 p.

Neave, V. H. (1986) *En: Introducción a la tecnología de productos pesqueros.* CECSA. 470 p.

Oreskovich, D. C.; Bechtel, P. J.; McKetith, F. K.; Novakofski, J. & Basgall, E. J. (1992) Marinade pH Affects Textural Properties of Beef. *Journal of Food Science.* 57(2):305-311.

Osuna, O. (1985) Toxicología Aviar: Vómito negro.- Modelos experimentales y Concentraciones de Histidina en la Harina de Pescado. *Avicultura Profesional.* 2(4):143-146.

Pearson, D. (1971) *En: The chemical analysis of foods*. 6th ed. Chemical publishing company. 604 p.

Pérez-Salmerón, L.A. (1985) *En: Higiene y control de los productos de la pesca*. CECSA. 162 p.

Raa, J. (1980) Utilization of Fish By-Catch Fish on Shrimp Trawlers. *Report to FAO* (Fisheries Department) Based on a visit to Thailand and Malaysia during September 1980. 30 p.

Raa, J. & Gildberg, A. (1976) Autolysis and proteolytic activity of cod viscera. *J. Food Technol.*, 11:619

Raa, J. & Gildberg, A. (1982) Fish Slage: A review. *En: CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 116:343-419

Raa, J.; Gildberg, A. & Strøm, T. (1983) Silage Production-Theory and Practice. *En: Upgrading Waste for Feeds and Food*. (Leward, D.A.; Taylor, A.V. & Lawrie, R.A. ed.) Butterworths. 8:117-132.

Ringo, E. (1991) Effects of dietary lactate and propionate on growth and digesta in Artic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture*. 96: 321-333.

Sikorski, Z. E.; Scott, D.N. & Buisson, D.H. (1984) The role of collagen in the quality and processing of fish. *En: CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 20(4):301-343

Spinelli, J. (1983) Fish silage process Used to Improve Cereal-based Feed Ingredients. *Activities report*. Northwest and Alaska Fisheries Center. Utilization Research Division. United States Department of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service. Seattle, Washington.

Steel, R.G. & Torrie, J.H. (1988) *En: Bioestadística: Principios y procedimientos*. 2ªed. McGraw Hill. 622p.

Stone, F.E. & 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.; & Scott, T.M. (1989) Utilization of Fish Silage by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 76: 109-118.

Tatterson, I. & Windsor, M.L. (1973) Torry tests practical value of fish silage. *Developments in processing* No. 443. Torry Research Station. Fish Mark. Procc. Packag., U.K.

Viana, M.T. (1982) Una alternativa a la utilización de subproductos de la fauna de acompañamiento del camarón. Composición química de microensilajes de subproductos

pesqueros y desperdicios agrícolas. *Tesis* para obtener el título de Bióloga. México, D.F. U.N.A.M. 55p.

Wekell, J.C. (1981) Fish Silage as an Aquaculture Ingredient. *Activities report*. Northwest and Alaska Fisheries Center. Utilization Research Division. United States Department of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service. Seattle, Washington.

Wekell, J.C. (1982) Fish Silage as an Aquaculture Feed Ingredient. *Activities report*. Northwest and Alaska Fisheries Center. Utilization Research Division. United States Department of Commerce. National Oceanic and Atmospheric Administration. National Marine Fisheries Service. Seattle, Washington.

Windsor, M y S. Barlow. (1984) *En*: Introducción a los subproductos de pesquería. Traducido, título original: Introduction to fishery by-products. Ed. Acribia España. 204p.

Zaitsev, V.; Kizevetter, I.; Lagunov, L.; Makarova, T.; Minder, L. & Podsevalov, V. (1969) *En*: Fish Curing and processing. MIR Publisherd Moscow (translated from the Russian by Merindol, A.). 197p.

APENDICE

Tabla IV. Valores promedio con desviaciones estándar del porcentaje de líquido en los diferentes tratamientos: AFC, IFC y ASA.

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	24.26	6.36	41.17	5.48	47.87	4.73
1	40.05	1.62	43.18	1.09	45.55	2.12
2	45.39	1.95	43.64	1.47	48.09	0.98
3	44.44	3.51	44.99	1.46	46.34	0.98
5	44.76	2.73	43.71	1.50	48.09	2.55
7	46.34	2.47	42.86	1.53	46.98	3.24
9	49.36	0.22	41.75	1.11	49.05	0.67
15	50.92	2.88	42.92	1.43	61.89	0.96
20	61.06	2.57	42.80	1.28	61.21	0.77
25	62.53	2.14	43.01	1.44	54.12	1.37
30	61.48	1.19	44.58	1.72	54.87	1.07
40	63.01	1.75	41.42	3.50	55.86	0.45
50	61.90	1.69	41.90	1.95	55.23	1.78
60	62.84	0.81	39.20	1.19	54.76	1.78
90	65.07	0.45	45.71	0.00	59.50	1.34

Tabla V. Valores promedio con sus desviaciones estándar, de la Actividad Enzimática de los diferentes tratamientos: AFC, IFC y ASA, dado en $\mu\text{mol Tyr eq/ml} \times \text{h}$

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	26.118	8.350	2.738	0.630	30.674	0.640
1	31.516	5.140	1.647	2.160	27.738	0.810
2	33.103	1.350	0.649	0.650	26.400	0.480
3	26.951	1.810	0.485	0.320	25.059	1.700
5	26.713	4.300	0.698	0.420	25.490	0.940
7	23.083	6.570	0.926	0.680	24.470	0.590
9	24.631	4.210	2.498	1.630	24.910	0.460
15	26.271	3.830	0.942	0.580	25.714	0.690
20	19.981	6.890	2.397	1.800	22.140	0.900
25	22.447	4.310	2.078	0.970	20.572	2.120
30	27.026	1.310	0.365	0.700	19.177	0.190
40	29.577	2.470	3.141	0.140	17.789	9.320
50	24.012	1.670	2.316	0.400	20.647	3.810
60	21.965	0.880	0.694	0.190	17.835	1.510
90	23.301	3.760	0.210	0.100	15.912	1.730

Tabla VI. Valores promedio del contenido de Proteína Soluble en los diferentes tratamientos: AFC, IFC y ASA dada en mg de proteína /g de ensilaje

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	8.58	2.01	14.45	1.69	17.34	2.01
1	14.57	0.31	14.52	0.63	17.18	1.24
2	16.12	0.63	15.39	0.45	17.61	0.74
3	16.25	1.04	16.16	0.83	17.11	0.81
5	16.53	0.98	15.42	0.57	18.39	1.80
7	17.24	0.89	15.42	0.77	17.57	1.54
9	17.13	0.74	15.18	0.85	18.55	0.42
15	17.25	1.06	15.39	1.41	23.54	1.01
20	22.49	1.36	15.28	0.52	23.03	0.70
25	22.25	0.21	14.65	1.47	20.43	1.01
30	21.80	0.07	15.99	0.95	20.98	1.33
40	21.19	0.39	14.56	1.37	21.07	0.92
50	20.83	0.15	15.50	0.67	20.88	1.77
60	21.14	0.58	14.57	0.36	21.93	0.48
90	22.10	0.24	17.81	0.02	25.59	1.63

Tabla VII. Valores promedio de la cantidad de aminoácidos libre de los diferentes tratamientos: AFC, IFC y ASA, dados en mg de proteína /g de ensilaje.

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	0.70	0.14	1.01	0.19	1.17	0.16
1	1.12	0.16	1.04	0.07	1.14	0.03
2	1.17	0.17	1.09	0.14	1.27	0.08
3	1.21	0.22	1.14	0.11	1.21	0.02
5	1.25	0.23	1.12	0.12	1.25	0.11
7	1.36	0.36	0.92	0.16	1.27	0.14
9	1.39	0.22	1.08	0.10	1.37	0.03
15	1.41	0.18	1.11	0.05	1.80	0.04
20	1.44	0.11	1.10	0.04	1.80	0.04
25	1.38	0.21	1.18	0.04	1.60	0.06
30	1.72	0.01	1.26	0.05	1.76	0.02
40	1.61	0.04	1.07	0.10	1.83	0.12
50	1.52	0.09	1.10	0.04	1.73	0.13
60	1.73	0.08	1.09	0.03	1.62	0.05
90	2.0	0.14	1.29	0.01	1.85	0.04

Tabla VIII. Resultados de los promedios de la cantidad de bases volátiles totales determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	52.00	3.56	75.33	4.11	54.67	0.94
1	59.33	9.29	78.00	5.66	58.33	0.47
2	60.67	4.99	78.00	8.16	50.00	4.08
3	57.33	5.25	84.67	6.18	48.67	6.60
5	74.33	0.94	72.33	8.18	64.33	4.19
7	68.00	5.89	82.00	1.63	63.33	4.71
9	78.00	8.16	74.00	4.32	63.00	4.97
15	79.33	7.36	74.00	2.94	65.00	5.10
20	66.67	4.99	76.33	3.09	72.67	3.77
25	83.67	7.85	77.67	2.05	78.67	2.62
30	90.00	0.00	83.00	3.74	81.33	1.89
40	83.33	4.71	87.00	3.27	80.00	1.63
50	103.33	4.71	93.33	3.86	87.00	1.41
60	134.00	12.33	87.67	2.05	96.00	2.83
90	223.33	82.60	243.33	55.58	246.67	57.35

Tabla IX. Resultados de los promedios de la cantidad de trimetilamina (TMA) determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}/100\text{ g}$ de ensilaje.

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	36.67	5.10	28.00	1.63	23.00	2.45
1	49.33	11.59	43.00	8.98	47.33	2.49
2	41.33	2.49	40.00	8.16	26.67	2.36
3	33.83	4.90	37.33	8.99	24.67	6.60
5	64.00	1.63	47.33	4.50	48.33	6.02
7	53.33	9.57	59.33	4.11	50.00	0.00
9	63.67	10.08	50.00	6.53	50.00	2.94
15	62.83	8.80	48.33	6.13	50.00	4.08
20	54.67	5.73	50.00	6.53	51.67	4.50
25	70.00	6.53	59.00	5.35	63.67	3.30
30	62.33	6.13	68.33	6.13	68.33	1.70
40	30.17	8.17	65.50	2.68	59.33	4.11
50	28.33	9.39	70.00	3.56	65.00	4.97
60	70.00	16.33	61.67	2.36	76.00	5.66
90	80.00	50.99	110.00	29.44	130.00	53.54

Tabla X. Resultados de los promedios de la cantidad de Amonio determinada en las réplicas de los ensilajes AFC, IFC y ASA, dada en $\mu\text{mol N}$ /100 g de ensilaje.

DIA	AFC	Sn	IFC	Sn	ASA	Sn
0	15.67	2.72	47.33	3.77	31.67	1.70
1	10.00	4.90	35.00	10.61	11.00	2.16
2	19.33	7.36	35.33	3.77	23.33	2.36
3	23.50	10.02	47.33	7.72	24.00	4.32
5	10.33	1.89	25.00	7.07	16.00	3.27
7	14.67	3.77	22.67	5.25	13.33	4.71
9	14.33	2.87	24.00	4.32	13.00	3.27
15	16.50	1.78	25.67	3.40	15.00	3.56
20	12.00	1.63	26.33	3.86	21.00	2.45
25	13.67	1.70	18.67	3.30	15.00	0.82
30	27.67	6.13	14.67	2.49	13.00	3.56
40	53.17	9.31	21.50	0.71	20.67	2.49
50	75.00	5.72	24.00	0.82	20.67	1.70
60	64.00	4.32	26.00	1.41	20.00	2.83
90	126.67	44.97	133.33	26.25	116.67	4.71