

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**HIDROLIZADOS PROTEICOS DE PESCADO
OBTENIDOS POR MÉTODOS BIOLÓGICOS**

POR



María Florencia BALDOVINO PACCE
Stella Maris LUJAMBIO GENTA
Leonora BALZANI PUJOL

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección, Control y
Tecnología de los Alimentos de Origen
Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental



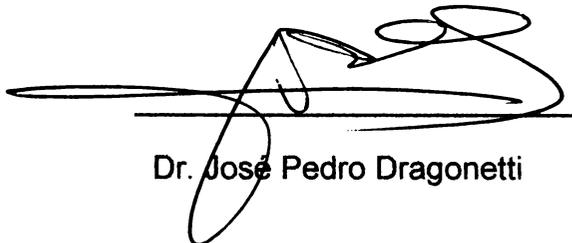
**MONTEVIDEO
URUGUAY
2011**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TUTOR: Dra. Cristina Friss de Kereki

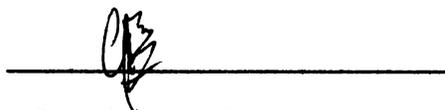
TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:



Dr. José Pedro Dragonetti

Segundo Miembro (Tutor):



Dra. Cristina Friss de Kereki

Tercer Miembro:



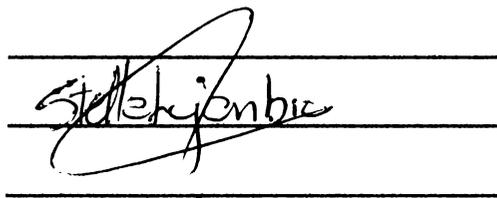
Dra. Cristina López

Fecha:

Autoras: María Florencia Baldovino Pacce

Stella Maris Lujambio Genta

Leonora Balzani Pujol



29279

FA

10

-2-

104

Aprobado en

10 (diez) 

AGRADECIMIENTOS

Le agradecemos a nuestra tutora Dra. Cristina Friss de Kereki por su incondicional ayuda, paciencia y dedicación. Al Dr. José Pedro Dragonetti por los consejos aportados en el transcurso de este trabajo.

También agradecemos a todo el personal del Instituto de Investigaciones Pesqueras por la colaboración y la ayuda prestada.

A los funcionarios de biblioteca por su disposición y amabilidad; en especial a la Licenciada Rosina Vilaró.

A nuestras familias por el apoyo y “el aguante”.

Y por último y no menos importante a nuestros empleadores por la tolerancia y el apoyo ante nuestras ausencias.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
1. PÁGINA DE APROBACIÓN	2
2. AGRADECIMIENTOS	3
3. LISTA DE GRÁFICOS Y TABLAS	5
4. RESUMEN	6
5. SUMMARY	6
6. INTRODUCCIÓN	7
7. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
7.1 Usos del ensilado de pescado	16
7.2 Calidad del ensilado	17
7.3 Comparación del ensilado con harina de pescado	18
8. OBJETIVOS	19
9. HIPOTESIS	19
10. MATERIALES Y MÉTODOS	20
10.1 Materiales	21
11. RESULTADOS	22
12. DISCUSIÓN	28
13. CONCLUSIONES	29
14. BIBLIOGRAFÍA	30
15. ANEXOS	32
15.1 Anexo 1	32
15.2 Anexo 2	33

LISTA DE GRÁFICAS Y TABLAS

	Página
Gráfica 1. pH vs tiempo muestra A	23
Gráfica 2. pH vs tiempo muestra B	23
Gráfica 3. pH vs tiempo muestra C	24
Gráfica 4. Comparación de los tres ensayos	24
Tabla 1. Estabilidad del ensilado durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Muestra A	25
Tabla 2. Estabilidad del ensilado durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Muestra B	25
Tabla 3. Estabilidad del ensilado durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Muestra C	26
Tabla 4. Resultado de Análisis Químico. Muestra A	27
Tabla 5. Resultado de Análisis Químico. Muestra B	27

4. RESUMEN

Se realizaron cuatro ensayos (cinco repeticiones) con el objetivo de obtener un hidrolizado biológico de pescado a partir de bacterias del yogur. En todos los ensayos se utilizó 1 kg de pescado de las especies pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) y merluza (*Merluccius hubbsi*) 10% de melaza, 1% de sacarosa. Las variantes fueron, ensayo A con un 3% de inóculo, ensayo B con un 5% y ensayos C y D con un 3% de inóculo y 10% de agua. Los ensayos A, B y C se incubaron en estufa a 43°C por 48 horas, el ensayo D se dejó a temperatura ambiente. Se obtuvo la hidrólisis completa de los ensayos llevados a estufa por 48 horas, lográndose un pH de 4.5 y una vida útil de 30 a 90 días. En el ensayo D no se observó hidrólisis, desechándose la muestra. Las concentraciones de 3% de inóculo, 10% de melaza y 1% de sacarosa fueron suficientes para producir una fermentación rápida y sostenida. Se alcanzaron valores de pH en un rango 4.07-4.92 a las 48 horas de incubación a 43°C.

5. SUMMARY

Four trials (five repetitions) were done to obtain a biological fish hydrolyzate from yoghurt bacterial. In all trials were used 1 kg of fish species: stripped weakfish (*Cynoscion guatucupa*) and hake (*Merluccius hubbsi*), 10% molasses, 1% sucrose. The variants were tested with 3% of inoculum for A, test with 5% for B and C and D trials with 3% inoculum and 10% water. The tests A, B and C were incubated in an oven at 43°C for 48 hours, leaving the trial D at room temperature. Complete hydrolysis was obtained at 48 hours, achieving a pH of 4.5 and a shelf time of 30 to 90 days. In study D hydrolysis was not observed, discarding the sample. At concentrations of 3% inoculum, 10% molasses and 1% sucrose are sufficient to produce rapid and sustained fermentation. The values of pH were reached in the range 4.07-4.92 at 48 h of incubation at 43 ° C.

6. INTRODUCCIÓN

El ensilado de pescado es un subproducto que se elabora principalmente a partir de residuos de la industria pesquera. Es producido como resultado de la auto digestión con adición de ácido o fermentación biológica y usado para la alimentación animal (Fernández, 2001). Es un alimento que posee gran digestibilidad, las proteínas que lo constituyen son de un elevado valor biológico (Bertullo, 1956; Copes, 2006)

La actividad proteolítica de las enzimas de las vísceras del pescado, combinado con un ajuste de pH, ha sido usada durante muchos años a nivel mundial en la reducción de los desechos de la industria pesquera (Pigott, 1990).

En la elaboración del ensilado se genera un descenso del pH a valores cercanos a 4. De esta manera, se activan las enzimas propias del pescado produciendo su autólisis. Como consecuencia se modifican características intrínsecas que inhiben el desarrollo de bacterias del deterioro y patógenas, que le confiere al producto una conservación prolongada en el tiempo, a temperatura ambiente (Copes, 2006).

La tecnología del ensilaje es muy antigua sus comienzos nos remontan a principios del siglo xx, en Dinamarca, Suecia, Finlandia y Francia (FAO, 1989).

Esta tecnología se ha desarrollado en muchos países europeos originándose en Suecia en el año 1926, los ensayos eran llamados A.I.V (siglas del nombre del inventor, A.I.Virtanen), utilizándose en estos ensayos ácido fórmico y sulfúrico. Continuándose en Dinamarca en el año 1952 llegando a la producción de 15.000 toneladas métricas anuales. En el año 1954 se inician experiencias en la alimentación de cerdos destinado principalmente para el engorde de animales de granja (Bertullo, 1956).

El ensilaje surge como una solución al aprovechamiento de los desechos orgánicos de la industria pesquera los cuales muchas veces no son utilizados. Además los ensilados no producen efectos perjudiciales en el medio ambiente debido a que cuando es correctamente elaborado y almacenado no despiden olores ni deja

desechos como sucede en la fabricación de harinas de pescado. Existen procedimientos artesanales, semiautomáticos y automáticos para la producción de ensilados, también podrían clasificarse en artesanales cuando son llevados a cabo por los propios pescadores artesanales en sus respectivas zonas, y de industriales cuando media una industria (FAO, 1989).

En los años '80, la FAO impulsa investigaciones sobre ensilados biológicos en el ámbito latinoamericano. Los resultados se expusieron en la Segunda Consulta de expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina celebrada en Montevideo en 1989 (FAO, 1990).

Durante el 2001-2002 en Argentina en el Centro de Desarrollo Acuícola de Aguas Cálidas en conjunto con el Instituto de Desarrollo Pesquero se implementa la tecnología de ensilados químicos como una alternativa para la disminución de costos para dietas de peces. En el año 2004 reaparece el tema pero con el desarrollo de ensilados proteicos de origen biológico (Manca, 2010).

En Uruguay se comienza con los primeros estudios en manos del Prof. Dr. Víctor H. Bertullo, en el año 1953 (Bertullo, 1956).

Se utiliza para el desarrollo del ensilado de pescado una levadura identificada como *Hansenula montevideo*, la cual actúa sobre la proteína de pescado y con una fuente energética como azúcar, melaza o frutas, hidroliza la proteína de pescado produciendo un líquido pastoso (FAO, 1989).

Algunos de los usos que surgen de este experimento consisten en la alimentación de cerdos y aves. No se observa en estos experimentos rastros de olor, sabor a pescado en ninguno de los subproductos. También se utiliza el ensilado como alimento para peces de acuario y cebo en la pesca con excelentes resultados (Bertullo, 1956).

Los hidrolizados proteicos de pescado han resultado útiles en la formulación de sustitutos parciales de leche y productos lácteos, como suplementos en la formulación de productos a base de cereales y sopas deshidratadas y se han

incluido en productos extruidos a base de almidón. Tanto se utilizan en la alimentación de peces, como en el cultivo de microorganismos como fuente de carbono, nitrógeno y minerales (Douglas, 2007).

La producción de ensilado de pescado es económica, se realiza sin la adquisición de máquinas costosas como en el caso de la harina de pescado permitiendo que pequeños granjeros puedan elaborar ellos mismo el producto, un desecho que se tira al mar o que proporciona una harina de bajo contenido proteico se transforma en huevos, carne, leche. El ensilado es un alimento rico en vitaminas termo-lábiles y termo-estables a diferencia de la harina de pescado que no posee las primeras, el elemento proteico transformado en aminoácidos se mantiene en su totalidad lo que no sucede con la harina de pescado (Bertullo, 1956).

En el presente trabajo se utilizó pescado y residuos de pescado (principalmente pescadilla *Cynoscion guatucupa* y merluza *Merluccius hubbsi*). Se inocularon con 3% y 5% de diferentes cultivos lácticos (*Lactobacillus delbruecki subsp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus spp*). Como fuente energética se utilizó melaza al 10% y sacarosa al 1%. También se prepararon ensayos con el agregado de un 10% de agua. Luego se incubaron algunas muestras a temperatura ambiente y otras en estufa a 43°C.

7. REVISION BIBLIOGRÁFICA

Los ensilados proteicos de pescado pueden obtenerse por varios métodos, químicos, enzimáticos y biológicos. En el caso del ensilado químico se utilizan diferentes ácidos (ácidos sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido fórmico) responsables de la preservación del producto. La hidrólisis ácida consiste básicamente en someter al músculo de pescado a la acción de un ácido, por ejemplo, ácido clorhídrico (Aurrekoetxea, 2001).

En los ensilados químicos se utilizan ácidos o álcalis, estos han sido las primeras iniciativas que se desarrollaron en el mundo occidental, son una mezcla de pescado o residuos de pescado con ácidos o álcalis, esta mezcla permite intrínsecamente el control de las bacterias de la putrefacción las cuales no son capaces de desarrollarse al alcanzar el producto un pH de 4. Desde el punto de vista bioquímico, la utilización de ácido fórmico permite obtener ensilados de pH 4 a 4.5 y es capaz de detener el crecimiento de microorganismos del deterioro sin necesidad de neutralización final. Los ácidos minerales como el clorhídrico o el sulfúrico son de menor costo, su manipulación es más riesgosa, se utiliza menos cantidad y es necesaria la neutralización final del producto antes del consumo (FAO, 1989).

Como ejemplo de ensilado químico podemos citar el trabajo realizado por Copes en el año 2006 en el cual se utiliza como materia prima residuos del fileteado de pejerrey (cabeza, tronco y vísceras), filetes defectuosos y algunos pescados enteros. Luego se adiciona a la mezcla una solución de ácido sulfúrico al 20% en forma gradual, hasta estabilizar el pH en 4. El picado produce una pasta uniforme, que permite el contacto homogéneo con los ácidos. Luego del picado y con el uso de los dos ácidos (ácido fórmico y sulfúrico) se logra el pH buscado de 4, manteniéndose cerca de ese valor durante 30 días. Al día cero el ensilado presenta características de textura untuosa y su color es gris claro. Después de 5 días, se transforma en una pasta de color marrón, adhesiva (queda adherido a las paredes y mantiene su forma). Una de las partes más importantes en la elaboración de este ensilado es la molienda del pescado. Con respecto a la acidificación, el agregado de 2,8% de ácido fórmico no es suficiente para llegar a un pH de 4, lo cual se logra con la adición de

ácido sulfúrico al 20%. El pH que se alcanza con el agregado de ácidos genera características intrínsecas que no son aptas para el desarrollo de muchas especies bacterianas, por lo cual resulta irrelevante la carga microbiana inicial de la materia prima. Se considera importante resaltar, que en los meses de otoño e invierno las temperaturas son bajas, influyendo en el desarrollo microbiano en los ensilados que utilizan esta metodología (Copes, 2006).

Por lo expuesto, el autor concluye que el producto posee una sumatoria de ventajas para los pequeños productores que justifican la implementación del ensilado químico en los establecimientos de acuicultura:

- Materia prima económica y de fácil obtención.
- Maquinaria de proceso barata y sin complicaciones de operatividad.
- Insumos accesibles (ácidos).
- Sencilla operatividad y manipulación.
- Prolongada vida útil (Copes, 2006).

Entre la experiencia latinoamericana encontramos la de la República Argentina, con trabajos de ensilados de pescado ácidos, donde se utilizan residuos de merluza, lenguado, anchoíta entera junto con ácido sulfúrico e incubado a 37°C-40°C. El pH que se logra es de 2-2.5 y durante los primeros días se adiciona ácido para mantener esos valores. Los autores de este trabajo (Manca, 2010) concluyen que el uso de ácido sulfúrico para fabricar ensilados ácidos de pescado es satisfactorio, el producto es estable y no presenta problemas de putrefacción ni cambios de pH (FAO, 1989).

La hidrólisis enzimática muestra ventajas que se relacionan con las características generales de las enzimas utilizadas, como ser mayor selectividad por los sustratos, procesos en condiciones térmicas menos drásticas y controlables lo que minimiza el desarrollo de reacciones adversas alterantes, manteniendo de esta forma el valor nutricional del producto (Douglas, 2007).

La hidrólisis enzimática presenta diferentes ventajas frente a los métodos químicos de procesado para la obtención de hidrolizados proteicos entre las que se pueden citar:

- a. La especificidad de acción de la enzima, lo que posibilita el control de las características en el producto final.
- b. Las condiciones de reacción suaves en las que tiene lugar la digestión de las proteínas que permiten obtener un producto soluble de elevada calidad, ya que el músculo no es sometido a temperaturas y pH extremos ni a la acción de disolventes orgánicos, bases o ácidos que pudieran comprometer el valor nutritivo del producto final.
- c. La no destrucción de aminoácidos esenciales que hace que la proteína retenga su valor nutritivo mejor que los hidrolizados ácidos y básicos tradicionales.
- d. Y la inactivación de la enzima por calentamiento haciéndose innecesaria su eliminación del medio de reacción.

Por ello, la hidrólisis enzimática aparece como una de las tecnologías más extendidas para la obtención de hidrolizados proteicos a partir de subproductos de la pesca. Se encuentran referencias en la bibliografía de gran variedad de enzimas que se utilizan para estos fines partiendo de materias primas diferentes, como por ejemplo, residuos de túnidos, sardina, arenques, subproductos del procesado de langostinos, etc (Aurrekoetxea, 2001).

Se deben tener en cuenta muchos factores cuando se desarrollan hidrolizados proteicos con fines comerciales que contengan características físicas, químicas y nutricionales. Dichos factores incluyen:

- La calidad del producto que se va a fabricar.
- La elección de la fuente adecuada de proteína.
- La elección de enzimas proteolíticas y sus parámetros.
- El desarrollo de los procesos post- hidrólisis (Borrás, 2009).
- La hidrólisis enzimática parece ser el método más adecuado para la preparación de péptidos a medida. Los procesos post hidrólisis son necesarios para fabricar un producto adecuado, los más comunes están relacionados con el control del tamaño molecular y la eliminación del sabor amargo de los hidrolizados. La ultrafiltración es el procedimiento más eficaz para eliminar los péptidos y las proteínas de alto peso molecular (Borrás, 2009).

Aurrekoetxea (2001) trabaja con cuatro enzimas comerciales y selecciona en función del tipo de actividad (endo o exopeptidasas), a la bioproteasa LA450 (GYGYC

BIOCOM) por el mayor grado de hidrólisis que logra durante las primeras horas de reacción. El mayor grado de hidrólisis se logra durante los primeros 30 minutos de reacción. Conseguir un grado de hidrólisis elevado en un periodo relativamente corto es de gran interés ya que facilita la aplicación de la operación a escala industrial y la fabricación en régimen continuo (Aurrekoetxea, 2001).

Se define el ensilado biológico de pescado al producto líquido elaborado a partir de una masa de pescado entera o residuos triturados, previa adición de carbohidratos y bacteria ácido-lácticas, bajo condiciones controladas (FAO, 1990).

El ensilado biológico se produce adicionando al pescado picado una fuente de carbohidratos (ej: melaza) y un inóculo de microorganismos que utilizan los azúcares como fuente de energía para desarrollo y producción de ácido láctico que preserva el pescado al limitar la actividad de las bacterias putrefactivas y crea un ambiente favorable a las enzimas para la producción del ensilado (Berenz, 1999; Copes 2006).

En el ensilado microbiano o biológico se le agrega al pescado triturado una fuente de carbono y un microorganismo, capaz de utilizar el substrato y producir ácido láctico. Se han estudiado diferentes fuentes de carbono como harina de maíz, harina de avena, cebada malteada, arroz, azúcar, melaza, etc. y distintos microorganismo productores de ácido láctico como bacterias del yogur, levaduras (Parín, 1994).

Se han detectado grupos bacterianos utilizados en el ensilaje entre los cuales se señalan *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*; mohos y levaduras como *Aspergillus oryzae flavus*, *Saccharomyces platensis* y *Hansenula monteideo*, (FAO, 1989).

Las bacteria ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias gram positivas que comparten la característica de generar ácido láctico como producto del metabolismo fermentativo. Además se subdividen en homofermentativas producen como único o principal producto de fermentación ácido láctico y las heterofermentativas además producen etanol y anhídrido carbónico. Las BAL pueden producir compuestos antimicrobianos contra su flora competitiva, también producen una gran variedad de compuestos que contribuyen al sabor, olor, textura y consistencia de los alimentos fermentados. El principal efecto antimicrobiano es la

producción de ácido láctico y la reducción del pH, también producen otros compuestos antimicrobianos considerados de bajo peso molecular como peróxido de hidrógeno, CO₂, diacetilo y de alto peso molecular tales como bacteriocinas (Levin, 2003).

V.H. Bertullo en sus estudios realizados con *Hansenula montevidео*, menciona una de las características más salientes del ensilaje biológico y es que la proteína se hidroliza en un 75-85% estando el 60% de ésta bajo forma de polipéptidos y el 40% restante como aminoácidos libres esenciales y no esenciales.

Los aminoácidos obtenidos en esta fermentación se mantienen en forma L (levógira) a diferencia de los obtenidos por métodos físicos o químicos que se transforman en la forma D (dextrógira) o mezcla de ambos. La forma L es mejor absorbida por los monogástricos (FAO, 1989).

Los microorganismos productores de ácido pueden estar presentes en la materia prima o en otros casos se requiere el uso de cultivos iniciadores puros, se utiliza una fuente de carbohidratos fermentables para la producción de ácido. La licuefacción observada durante el almacenamiento del ensilado es debida principalmente a las enzimas proteolíticas de las vísceras de pescado (FAO, 1990).

El ácido producido favorece la acción de las enzimas e inhibe el desarrollo de bacterias patógenas; para realizar la fermentación el producto debe almacenarse a temperaturas comprendidas entre 20°C y 30°C rango en el cual se observa un crecimiento acelerado de las bacterias ácido-lácticas e inhibición de la flora competitiva de la materia prima (FAO, 1990).

En el 2001, Fernández realiza un hidrolizado de residuos de pescado por fermentación en sustrato sólido con hongos filamentosos, se utilizaron las cepas *Rhizopus oryzae* y *Rhizopus oligosporus* la inoculación se efectuó en residuos esterilizados y como fuente de hidratos de carbono se utilizó glucosa, sacarosa y harina de yuca. Siendo *Rhizopus oryzae* con una mayor actividad proteolítica y lipolítica,

Armenta en el 2002 realiza un trabajo sobre residuos de camarón, estos son un problema para la ecología debido a su descomposición al aire libre. Utiliza iniciadores lácticos en base a su habilidad para reducir el pH del medio en menos 24

horas. El autor de este trabajo observa una disminución de pH a 4.0 a las 48 horas de fermentación.

En el trabajo "Ensilados biológicos de pescado" realizado por Areche (ap. FAO, 1989), se utilizan bacterias del yogur *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* para producir la fermentación de residuos de pescado con sacarosa. Se incuban a 40°C por 48 horas y otras a ambiente a 18°C a 28°C por 7 días y es suficiente para producir acidez. El pH de 4 permite conservar el ensilado por 6 meses. En este trabajo para determinar la participación exclusiva en la fermentación de las bacterias del yogur se esteriliza los residuos de pescado y la sacarosa en autoclave a 115°C por 15 minutos y se mezclan en condiciones asépticas con el inóculo del yogur. Paralelamente se prepararan ensilados en condiciones normales es decir sin esterilizar utilizándose la misma formulación y tiempo de incubación. Se utilizan distintas concentraciones de sacarosa 0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10% y las concentraciones de inóculo utilizadas son 2.5%, 5%, 7.5%, 10%. Además se mide la concentración de histamina y las bases nitrogenadas volátiles en el ensilado así como se efectúa una prueba biológica alimentando cerdos con este ensilado. En los resultados se observa que la fermentación fue homo y heterofermentativas, en estos ensilados a las 24 horas hay un pH de 4.7 y a las 48 horas el pH es de 4. Se observa el crecimiento de hongos blanco algodonoso durante el almacenamiento. Otro dato relevante observado en los resultados es que con el agregado de 2.5% de sacarosa se llega a un pH de 4.3 en 48 horas, en cambio en los casos que no se agrega sacarosa no se observan cambios significativos en el pH. Al agregar una mayor concentración de sacarosa de 5%, 7.5% o 10% los cambios de pH a las 48 horas presentan un mejor comportamiento con una tendencia a seguir bajando a mayor tiempo de incubación, llegando a un pH de 4 en 48 horas en estas concentraciones. Con respecto al inóculo los mejores resultados se observan a concentraciones mayores de 5%, 7.5% y 10%, la temperatura de incubación fue de 40°C-45°C durante con 48 horas (FAO, 1989).

7.1 Usos del ensilado de pescado

Los ensilados son importantes ingredientes en la nutrición animal. Son usados para alimentar toda clase de especies animales como rumiantes, cerdos, pollos, animales de pieles, peces y mascotas. La composición química del ensilado húmedo indica un elevado porcentaje de agua (60-80%) y variables porcentajes de proteína bruta (12-19%) (Parin, 1994).

Las experiencias de alimentación productiva en animales domésticos realizadas en diversos países confirman las ventajas nutricionales de los ensilados de pescado. En Uruguay, ha sido ampliamente utilizado para la alimentación de cerdos en crecimiento y engorde, el ganado porcino se adapta muy bien a la alimentación pastosa, la calidad y el sabor de la carne no se altera y los costos de explotación son sensiblemente menores comparado con otros concentrados de proteína animal en raciones comerciales. En los estudios realizados por Bertullo en el año 1992 se concluye que el ensilado necesita menos pescado y menos unidades forrajeras para producir un kilogramo de carne porcina. La tasa de crecimiento de los cerdos fue mayor cuando el contenido de ensilado en a ración fue mayor al 5% (Parin, 1994).

En aves se ha utilizado la mezcla de raciones con ensilados químicos, bajando los costos de producción tanto en ponedoras como en parrilleros, se utiliza una proporción de ensilado de 3.7%. Raciones con un 4-5% de ensilado biológico de pescado no confieren ningún olor ni sabor a la carne de pollo y la producción de huevos es más alta (Parin, 1994).

Se utiliza también en la acuicultura como en la cría de salmónidos, es posible utilizar el ensilado con hasta un 20% de lípidos en base seca (Parin, 1994).

En nutrición de peces se considera el ensilado ácido en pellets como un alimento excelente en la alimentación de salmónidos y carpas. Mazzoni mezcla ensilado

biológico de pescado con ración balanceada para la fabricación de pellets destinados a la alimentación de rana toro (*Rana catesbeiana*) (FAO, 1989).

Otro uso es la utilización del ensilado de pescado como fertilizante tanto en vegetales como en suelos y también para plantas ornamentales y cultivos productivos en todos los casos con resultados prometedores, es una aplicación que no debe descuidarse (FAO, 1989).

7.2 Calidad del ensilado

La calidad organoléptica del ensilado se basa en el olor (aroma), el color, la consistencia y eventualmente el sabor. El olor es el indicador primordial de la calidad del ensilado y del pescado fermentado en general, una parte del aroma surge durante la fermentación estando constituido por aminas volátiles principalmente trimetilamina (TMA) y ácidos grasos volátiles, cuando se utilizan especies cartilaginosas el amoníaco puede ser dominante. El pH y la temperatura son determinantes en la percepción del olor, identificándose olores a levadura o champagne (FAO, 1989).

El sabor constatado más frecuentemente es “picante” por la acidez láctica y sabores amargos debido probablemente por péptidos de bajo peso molecular, los sabores “frutados” provienen de ésteres y los “cremosos” provienen de aldehídos y cetonas (FAO, 1989).

En los ensilados alterados prevalecen olores acéticos, butíricos y sulfúricos, el olor varía según los procesos y las características de las materias primas. La coloración del producto cambia durante el proceso predominante los colores cremosos, amarronados, grisáceos de diferente intensidad según los procesos, los ensilados alterados tienen un color oscuro.

Los ensilados de pescado podrían clasificarse en magros con un tenor graso menor al 3% de materia grasa y en ensilados grasos con un tenor graso mayor a 3% de materia grasa (FAO, 1989).

7.3 Comparación del ensilado con harina de pescado

Desde el punto de vista de la calidad proteica del producto final, el ensilado biológico demuestra mayores propiedades nutricionales en pruebas de alimentación en animales domésticos (FAO, 1989).

La harina tiene la ventaja de que es un proceso conocido, un producto polvo, estable y que posee un mercado y una demanda sostenida, fácilmente transportable en bolsas y comercializado en el mundo entero (FAO, 1989).

Por otra parte, existe una estandarización de las harinas de pescado en cuanto a su composición bromatológica, normas de calidad, etc. que la hacen un producto fluidamente comerciable. Los ensilados son productos en general poco estandarizados y menos conocidos (FAO, 1989).

8. OBJETIVOS

- 1) Desarrollar hidrolizados biológicos, utilizando bacterias lácticas.
- 2) Determinar la vida útil de los mismos.
- 3) Comparar la tecnología, los principales parámetros del proceso y el producto final con el hidrolizado producido con *Hansenula monteideo*.

9. HIPÓTESIS

- 1) Las concentraciones de 3% de inóculo, 10% de melaza y 1% de sacarosa, son suficientes para producir la fermentación del ensilado.
- 2) El agregado de un 5% de inóculo acelera la fermentación y mejora la conservación del ensilado.
- 3) Es posible lograr la hidrólisis a temperatura ambiente sin incubación en estufa a 43°C.
- 4) El agregado de un 10% de agua alarga la vida útil del hidrolizado.

Se realizaron cuatro ensayos, con cinco repeticiones, utilizando como variables la cantidad de inóculo, el agregado de agua y la temperatura.

Para la preparación del inóculo se utilizaron 2 litros de leche, se llevaron a 90°C dejándose enfriar luego hasta los 43°C. Luego se adicionaron 500 ml de yogur descremado natural (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*) y se incubó en estufa a 43°C. durante 6 horas. En todos los ensayos se utilizaron: las especies pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) y merluza (*Merluccius hubbsi*).

ENSAYO A: Se utilizó 1 kg. de pescado trozado y se le agregó un 3% de inóculo. Como fuente de energía se adicionó 1% de sacarosa y 10% de melaza. Luego se incubó a 43°C. durante 48 horas.

ENSAYO B: Se utilizó 1 kg. de pescado trozado y se le agregó un 5 % de inóculo. Como fuente de energía se adicionó 1% de sacarosa y 10% de melaza. Luego se incubó a 43°C. durante 48 horas.

ENSAYO C: Se utilizó 1kg de pescado trozado y se le agregó un 3% de inóculo y un 10% de agua. Como fuente de energía se adicionó 1% de sacarosa y un 10% de melaza. Luego se incubó a 43°C durante 48 horas.

ENSAYO D: Se utilizó 1Kg de pescado trozado y se le agregó un 3% de inóculo y un 10% de agua. Como fuente de energía se adiciono 1% de sacarosa y un 10% de melaza. Esta muestra se dejo a temperatura ambiente.

La materia prima sin eviscerar fue cortada en fragmentos pequeños de 2 cm aproximadamente para facilitar el ataque bacteriano; La mezcla se homogeneizó manualmente y se llevo a estufa a 43°C, como se menciono anteriormente.

Finalizada la incubación se registraron los valores de pH y temperatura de cada ensayo todos los días durante la primera semana haciéndolo luego con una frecuencia de 72 horas.

La anotación de los parámetros anteriormente mencionados finalizó una vez constatada la deshidratación y la presencia macroscópica de hongos en los ensayos.

10.1 Materiales

Materiales de laboratorio: vasos de Bohemia

recipientes plásticos

termómetro

medidor de pH

estufa

Muestras y reactivos: pescado

leche entera

yogur comercial

melaza

sacarosa

11. RESULTADOS

En los ensayos A, B y C se obtuvo un pH final de hidrólisis de 4,5 y este fue el pH de mantenimiento de las muestras.

Se obtuvo una vida útil del hidrolizado con un mínimo de vida útil de 30 días y un máximo de 90 días.

Las características fisicoquímicas y sensoriales del hidrolizado fueron (ver anexo 1):

- pH 4,5
- Olor ligeramente ácido, frutal, no ofensivo, sin presentar olor a pescado.
- Consistencia semipastosa.
- Color castaño claro.

Comparando los tres ensayos, A, B, y C, obtuvimos los siguientes resultados:

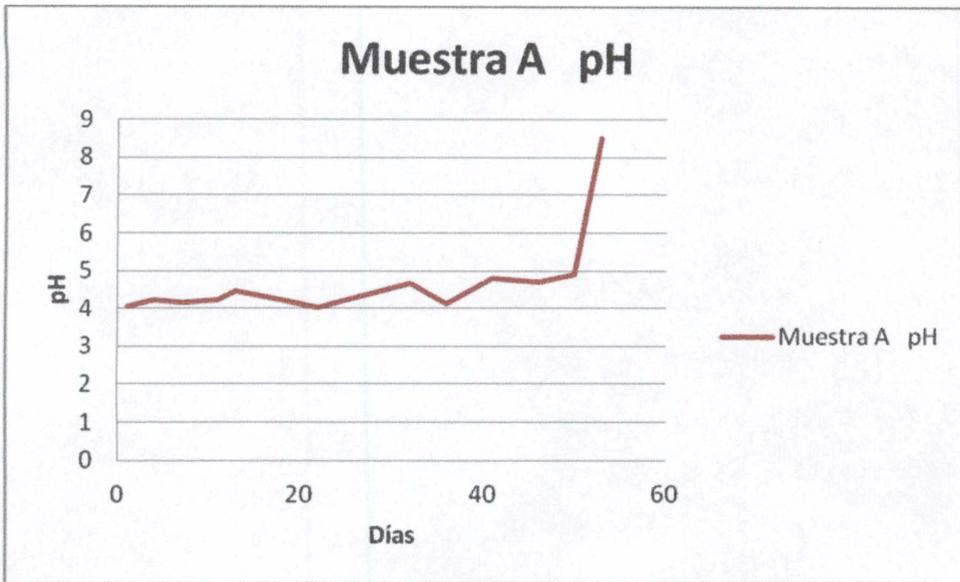
No se observaron diferencias cualitativas y cuantitativas entre el ensayo A con un 3% de inóculo y el B con un 5%.

En el caso del ensayo C, en el que se agregó 10% de agua, se constató una mayor vida útil.

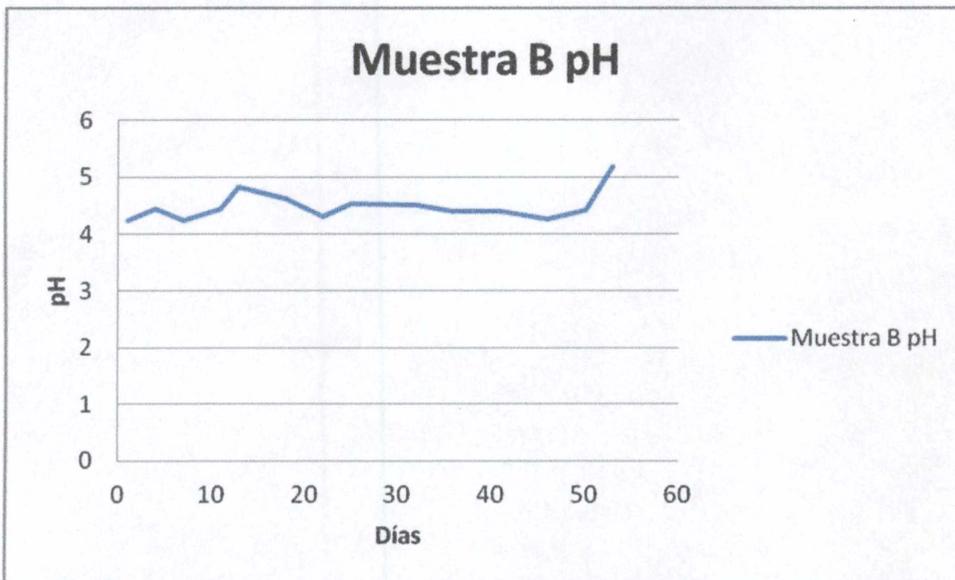
Cuando el pH aumentó por encima de 4,5 las características organolépticas del hidrolizado comenzaron a variar, el olor se tornó rancio y pútrido; y el color castaño más oscuro.

Con el transcurso del tiempo fue avanzando la deshidratación y se observó la presencia de hongos y el aumento de solidez de la muestra dificultando el mezclado de la misma.

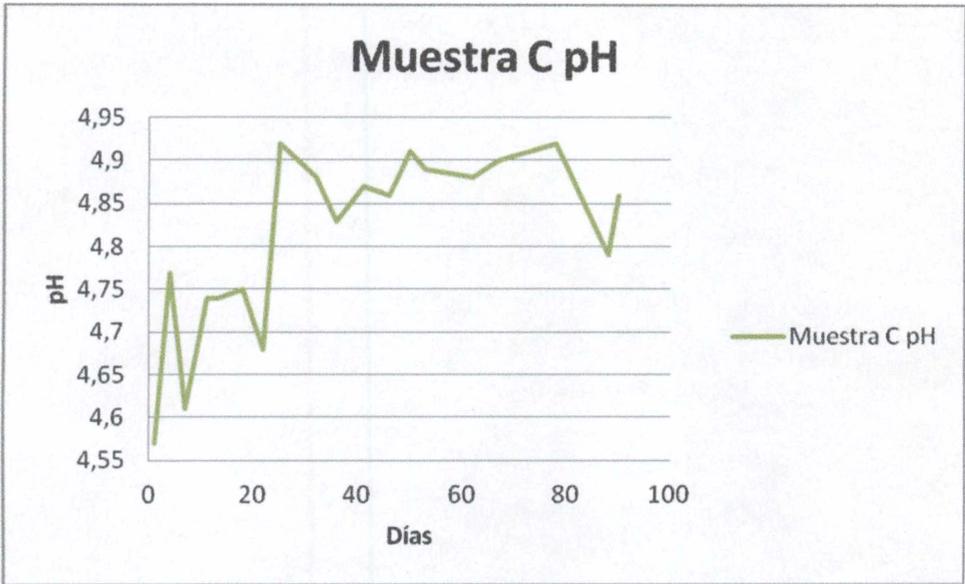
En el ensayo D se comprobó que no se logra la hidrólisis a temperatura ambiente descartándose la muestra a los 22 días de realizada por presentar signos de putrefacción.



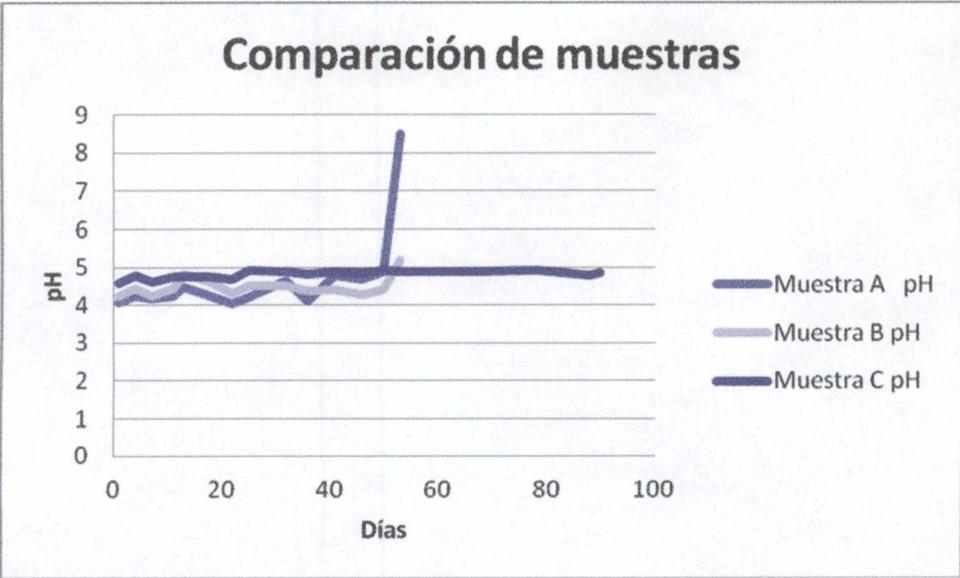
Grafica 1. pH vs tiempo muestra A.



Grafica 2. pH vs tiempo muestra B.



Grafica 3. pH vs tiempo muestra C.



Grafica 4. Comparación de los tres ensayos

Tabla 1. Estabilidad del ensilado durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Muestra A

Día	pH	Temperatura(°C)	Prop.organolépticas
1	4.07	22	Olor levemente ácido, pastoso, homogéneo
11	4.23	9	Pastoso, seco, olor suave
18	4.24	7	Pastoso, olor suave, seco
25	4.22	11	Consistencia seca, deshidratada
36	4.11	19	Olor mas fuerte
46	4.69	13	Presencia de moho verde y blanco.(ver anexo 2)
53	8.5	15	Presenta signos de putrefacción, se elimina la muestra

Tabla 2. Estabilidad del ensilado durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Muestra B

Día	pH	Temperatura(°C)	Prop.organolépticas
1	4.23	27	Olor levemente ácido, pastoso, homogéneo
11	4.44	9	Pastoso, seco, olor suave
18	4.62	7	Semi espeso, olor suave, formación de moho
25	4.53	11	Consistencia seca, pastosa, totalmente hidrolizada
36	4.39	19	Presencia de moho
46	4.27	13	Muy deshidratada, conserva el olor característico
53	5.18	15	Totalmente deshidratada, se elimina la muestra

Tabla 3. Estabilidad del ensilado durante su almacenamiento a temperatura ambiente. Muestra C

Día	pH	Temperatura(°C)	Prop.organolépticas
1	4.57	25	Olor levemente ácido, pastoso, homogéneo
11	4.74	9	Pastoso, seco, olor suave
18	4.75	7	Aspecto líquido homogéneo, olor suave
25	4.92	11	Consistencia líquida, totalmente hidrolizada
36	4.83	19	Idem anterior
46	4.86	13	Olor fuerte
53	4.89	14	Idem anterior
62	4.88	13	Consistencia líquida, olor fuerte
78	4.92	13	No se observan cambios
90	4.86	15	Presenta signos de putrefacción, se elimina la muestra

**Tabla 4. Resultado de Análisis Químico
Muestra A (Hidrolizado de pescado)**

Componente	% (base fresca)	%(base MS)
Materia Seca	33,58	-----
Cenizas	3,50	10,43
Extracto Etéreo	1,08	3,22
Proteína Bruta	20,85	62,09

Tabla 5. Muestra: B

Componente	%(base fresca)	%(base MS)
Materia Seca	28,53	-----
Cenizas	2,71	9,51
Extracto Etéreo	1,16	4,07
Proteína Bruta	17,13	60,04

Dpto. Nutrición-Facultad de Veterinaria

Universidad de la República

12. DISCUSIÓN

Se comprobó que no es necesaria la cocción, como lo realiza el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú que somete a cocción de 100 °C por 20 minutos; donde se paraliza la acción enzimática y destruyen gran cantidad de bacterias patógenas y de la putrefacción presentes en los residuos crudos.(Berenz, 1999).

La hidrólisis se completó luego de 48 hs en estufa a 43°C y el pH se mantuvo hasta 90 días a 4,5.

La temperatura (10-25°C) no afectó la estabilidad de las muestras, coincidiendo con el trabajo realizado por Toledo, (2006) que almaceno el ensilado a 28°C por 30 días sin observar signos de putrefacción y deterioro. Toledo, (2006).

Existió coincidencia con las características organolépticas halladas por Bertullo en 1992 y por Toledo, J, (2006) sin estar influenciadas por la temperatura.

Comparando los resultados de los análisis bromatológicos obtenidos por Toledo, J, (2006): Extracto Etéreo, (3,94) Proteína Bruta, (14,03) y cenizas, (6,81), resultó mayor la proteína bruta (A:20,85; B:17,13) el extracto etéreo (A:1,08; B:1,16) menor tanto en la muestra A como en la B.

Según la FAO (1989) se clasificaría en un ensilado magro ya que posee menos de un 3% de grasa; A 1,08; B 1,16.

En los trabajos de Bertullo entre los años 1964 al 1970 se utiliza como inóculo una especie de levadura denominada *Hansenula montevideo* en un porcentaje de 0.1% siendo éste menor al utilizado en este trabajo. Bertullo logra una completa hidrólisis a temperatura ambiente (5°C a 18°C) en 24 horas, a diferencia del inóculo con bacterias del yogur que sí necesita incubación en estufa a 43°C durante 48 horas para lograr la hidrólisis. En el ensayo D que se dejó a temperatura ambiente no se observó signo alguno de hidrólisis llegando a la putrefacción en 22 días.

13. CONCLUSIONES

- ✓ El hidrolizado (ensilado) fue obtenido de residuos de pescado, mediante un proceso de fermentación láctica con bacterias del yogur, donde se utilizó melaza y sacarosa como sustrato y fuente de energía.
- ✓ Las concentraciones de 3% de inóculo, 10% de melaza y 1% de sacarosa fueron suficientes para producir una fermentación rápida y sostenida.
- ✓ Se alcanzaron valores de pH en un rango 4.07 a 4.92 a las 48 horas de incubación a 43°C.
- ✓ La vida útil observada fue de 30 a 90 días.
- ✓ El agregado de un 10% de agua prolongó en treinta días más la vida útil del ensilado, y mantuvo la hidratación hasta el final, a diferencia de los ensayos sin agregado de agua, que culminaron deshidratados impidiendo su homogenización. Recomendándose la utilización de un 10% de agua en muestras a gran escala.
- ✓ Se dificulta la aplicación en un medio artesanal por la necesidad de incubar a 43°C durante 48 horas para lograr la hidrólisis, a diferencia de la utilización de *Hansenula montevideo* que es activa a temperatura ambiente.
- ✓ La utilización de especies magras como la pescadilla (*Cynoscion guatucupa*) y merluza (*Merluccius hubbsi*) favorece la conservación del ensilado en el tiempo, con un menor grado de enranciamiento.
- ✓ Se recomienda el uso de residuos de la pesca artesanal (cabezas, vísceras, espinas, trozos) para la obtención de ensilado biológico y de esta forma disminuir la contaminación ambiental de las zonas pesqueras costeras y acuícolas.
- ✓ Es una técnica de bajo costo, materiales accesibles, no necesita mano de obra calificada, generando un alimento de alto valor biológico y proteico para la nutrición animal.

14. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Armenta, E. (2002) Extracción de Caroproteínas a partir de Residuos de Camarón Fermentados. Revista de Ingeniería Química.1:49-55.
- 2) Aurrekoetxea, G. (2001) Aprovechamiento de recursos pesqueros infrautilizados para la obtención de alimentos mejorados de peces de acuicultura. Revista AquaTIC N° 13. Disponible en: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=105>
Fecha de consulta: 27/12/09.
- 3) Berenz, Z. (1999) Ensilado de residuos de pescado. Callao. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú.58 p.
- 4) Bertullo, V. (1956) El ensilado de pescado. Anales Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República Oriental del Uruguay; 6(4): 141-150.
- 5) Borrás, G. (2009) Centro Tecnológico del Mar (CETMAR). Disponible en: http://www.cetmar.org/documentacioneifabstract...Throkelsson_es.pdf. Fecha de consulta: 21/1/2009
- 6) Copes, J. (2006) Producción de ensilado de pescado en baja escala para uso de emprendimientos artesanales. Analecta Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata; 26 (1): 5-8.
- 7) Douglas, R. (2007) Caracterización de un hidrolizado proteico enzimático obtenido del pez Caribe colorado. Revista Interciencia, Caracas; 32(003): 188-194.
- 8) FAO, Food and Agriculture Organization, (1989). Desarrollo del Ensilado de pescado en América Latina.Segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina. Suplemento N° 441, p. 18-88.
- 9) FAO, Food and Agriculture Organization, (1990). Curso Regional sobre Tecnología de Productos Pesqueros, Programa de Cooperación Gubernamental. Caracas. p .3-15.
- 10) Fernandez, J. (2001) Tesis para optar el Grado de Magister Scientiae en Tecnología De Alimentos. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. Disponible en: <http://www.fishbase.org/search.php> . Fecha de consulta: 16/04/2010.

- 11) Manca, E. (2010) Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP). Mar del Plata. Disponible en: www.inidep.gov.ar Fecha de consulta: 22/2/2010.
- 12) Levin, A. (2003) Aislamiento, Identificación y Estudio de Características de Interés Tecnológico De Cepas Pertenecientes al Genero Lactobacillus. Tesis de grado, Universidad De La República, Facultad De Veterinaria. Montevideo. p. 7-29.
- 13) Parin, M. (1994) Capitulo 4: Aspectos económicos del Procesamiento y uso de ensilados de pescado. Centro de investigaciones Pesqueras y Alimentos Regionales (CITEP). Disponible en: [Http://www.fao.org/ag/agA/AGAP/FRG/APH134/cap4.htm](http://www.fao.org/ag/agA/AGAP/FRG/APH134/cap4.htm) Fecha de consulta: 23/3/2010.
- 14) Piggot, G. (1990) Seafood effects of Technology on Nutrition. New York, Marcel Dekker. p. 206-257.
- 15) Toledo, J. (2006) Estudio comparativo de los residuos de pescado ensilados por vías bioquímica y biológica. Revista Aquatic;25: 28-33.

15. ANEXOS

15.1 Anexo 1



Hidrolizado en condiciones óptimas

15.2 Anexo 2:



Hidrolizado no apto, presencia de moho