

# ESTUDIOS SOBRE EL METODO DE ENSILADO DE PESCADO DEL PROF. BERTULLO Y BACH. PEREZ HETTICH

Por:

Prof. Pierre Beraud\*, Q. I. Nestor Torres\*\* y Q. I. Saverio Marotta\*\*

(Presentado para su publicación el 27 de abril de 1962)

## INTRODUCCION

Entre los procedimientos de aprovechamiento de deshechos de pescado, debe reservarse un lugar privilegiado a los métodos microbiológicos de ensilado.

Ellos presentan varias ventajas sobre la simple transformación de los deshechos en harina y entre otras, la de permitir la utilización integral de toda la masa disponible de pescado. Por otra parte, el proceso de ensilado no afecta a las proteínas hidrosolubles y vitaminas, mientras que al transformar el pescado en harina, esas sustancias desaparecen en su mayor parte, por el cocimiento y secado a alta temperatura.

Para la preparación del ensilado se utilizan generalmente bacterias lácteas del tipo *Lactobacillus plantarum*, pero existe un proceso uruguayo del Profesor Victor H. Bertullo donde figura, como agente principal, una levadura.

El procedimiento, por su originalidad, merece una mención especial y he aquí en qué consiste: los desechos de pescado, una vez molidos, son mezclados con un 20 % de melaza aproximadamente; toda la masa es introducida en tanques (de preferencia tipo Dolmenit), donde es sembrada con una levadura especial. Normalmente, al cabo de ocho días, la fermentación ha terminado y la masa de color marrón ha adquirido una consistencia pastosa y un olor similar al de pasas de higo. Se puede conservar así durante varias semanas.

---

\* Profesor del Instituto Pasteur de Paris, contratado por A.N.C.A.P. para su División Investigaciones Científicas.

\*\* Técnicos de la División Investigaciones Científicas de la Administración Nacional de Combustibles, Alcohol, Portland (A.N.C.A.P.), Pando, Canelones, URUGUAY.

El ensilado de pescado preparado de esta manera, es un alimento de primer orden y el Prof. Bertullo ha dado interesantes precisiones sobre los resultados, muy alentadores, obtenidos en la alimentación de cerdos, vacunos, aves, caballos de carrera, etc. (1).

Uno de los resultados más espectaculares es el observado en la alimentación de cerdos: "Los concentrados para alimentación de suinos se fabrican con 30 % de ensilado y 70 % de cebada y permitieron obtener crecimientos que alcanzaron un promedio entre 1.060 y 1.200 grs. por día. En algunos casos se constataron crecimientos de 1.400 grs. diarios. Se hace notar que en Alemania consideran un buen promedio de crecimiento, el que oscila entre 700 y 800 grs. y utilizan una ración compuesta de 10 % de harina de pescado y 90 % de cebada."

Los resultados sumamente interesantes obtenidos con el ensilado de pescado, se deben ciertamente a la calidad de las proteínas que proporciona, a las sales de origen marino contenidas en la carne del pescado y a las vitaminas aportadas por los micro-organismos que intervienen durante la fermentación, en particular, por las levaduras.

Pero junto al interés económico, el procedimiento presenta también, un gran interés científico. No es común, en efecto, ver una levadura realizar una tarea de preservación y digestión tal como la que tiene lugar en este proceso.

Todas estas razones nos indujeron a realizar investigaciones sobre el procedimiento del Prof. Bertullo, iniciando así el estudio de subproductos de la pesca en Uruguay, que en 1958 fue confiado a la División de Investigaciones Científicas de ANCAP, por Resolución del Directorio de este Organismo, previa consulta al Prof. Bertullo y al Decanato de la Facultad de Veterinaria de Montevideo.

## MATERIAL Y METODO

### *Estudios sobre el Ensilado de Pescado, efectuados por la División Investigaciones Científicas*

El Prof. Bertullo había estudiado, sobre todo, el aspecto microbiológico de su procedimiento. Pensamos entonces que sería interesante, en primer lugar, seguir las transformaciones sufridas por la masa de pescado en fermentación, mediante el análisis químico. En mayo y junio de 1958 se llevaron a cabo estos estudios en el Departamento de Investigaciones Pesqueras y Biología Marina de la Facultad de Veterinaria, en colaboración con el Prof. Bertullo y el Bach. Pérez Hettich.

Las experiencias se realizaron sobre cantidades cercanas a los 50 kgs. de

pescado molido, mezclados con 10 kgs. de melaza de caña y sembrados con la levadura especial, descubierta por los nombrados universitarios y que denominan "L. L." \*

Los controles analíticos se efectuaron a intervalos previamente determinados; el pH se determinó electrónicamente con un potenciómetro Beckman, Modelo G; la acidez química por titrimetría y la digestión de las proteínas, que suponíamos fuese una transformación hasta el estado de ácidos amino, por el método de Sorensen, al formol.

He aquí los resultados obtenidos:

Tiempo en días	0	8	11	14	16	18
pH .....	6,5	4,9	4,9	5,0	5,1	5,1
Acidez (en grs. de ac. sulfúrico, por 100 grs. de mezcla) .....	0,129	0,686	0,864	0,857	0,913	0,906
Nitrógeno - formol (en grs. por 100 grs. de mezcla) .....	0,019	0,147	0,177	0,224	0,210	0,262

Se ve que la cantidad de nitrógeno-formol formado es muy débil en relación a la masa de pescado tratada.

Una primera indicación dada por esta experiencia fue que la fluidificación del ensilado debe corresponder a un proceso de degradación menos completo que el que suponíamos, probablemente a una peptonización.

Al cabo de ocho días, ya el ensilado había adquirido su consistencia semi-pastosa definitiva. Su olor era agradable y hemos verificado que podía conservarse varias semanas sin alteración.

Dos interrogantes importantes se plantean con respecto al ensilado preparado con intervención de la levadura:

- 1º) ¿Cómo se efectúa la conservación del pescado?
- 2º) ¿Cómo se realiza la semi-liquefacción de la masa?

Relataremos a continuación, las experiencias que hicimos para resolver estas interrogantes.

\* Posteriormente, en octubre de 1958, los descubridores clasificaron dicha levadura como "*Saccharomyces platensis proteolytica*, n.sp." y en adelante, en el trabajo se le denominará como S.p.p.

### ¿Cómo se efectúa la conservación del pescado?

Una primera comprobación, en lo que se refiere a conservación, es que el simple hecho de agregar melaza al pescado, favorece mucho su preservación. Esto se debe a un efecto antimicrobiano muy conocido debido a las altas presiones osmóticas, efecto que explica por ejemplo, la conservación de los dulces.

Sin embargo, si bien esto retarda la putrefacción del pescado, es insuficiente para eliminarla, como es fácil constatarlo dejando carne impregnada de melaza al aire libre.

Se pensó entonces que la conservación del ensilado se debería además, al alcohol producido por la levadura. La levadura *Saccharomyces platensis proteolytica*, es en efecto una levadura alcohólica con poder alcoholigeno bastante elevado.

He aquí los resultados dados por esta levadura sobre un medio de cultivo corriente, agua de raicillas sacarosada (decocción de 30 grs. de raicillas por litro de agua, filtración y adición de 100 grs. de sacarosa y un gramo de ácido tartárico).

#### *Composición inicial del liquido de cultivo (para 100 cms.3)*

Sacarosa .....	10 gramos
(correspondientes a 10,53 gramos de azúcar invertido)	
Alcohol (proveniente de la suspensión de siembra)	0 gr. 087

#### *Análisis después de 48 horas*

Azúcar residual (en azúcar invertido)	
en 100 cms.3 del medio .....	4 gr. 760
Alcohol formado (en 100 cms.3 del medio) ....	2 gr. 484

#### *A las 72 horas*

Azúcar residual .....	2 gr. 700
Alcohol formado .....	3 gr. 726

#### *A los 7 días*

Azúcar residual .....	0 gr. 125
Alcohol formado .....	4 gr. 968

He aquí, además, la marcha de la formación del alcohol en un ensilado realizado en el laboratorio:

Al cabo de	1 día	—	0.34	grs.	por	100	grs.	de	ensilado
"	"	"	2 días	—	1.31	"	"	"	"

"	"	"	4	"	—	3.10	"	"	"	"	"	"
"	"	"	7	"	—	3.31	"	"	"	"	"	"
"	"	"	9	"	—	4.24	"	"	"	"	"	"
"	"	"	11	"	—	3.53	"	"	"	"	"	"
"	"	"	12	"	—	2.96	"	"	"	"	"	"
"	"	"	13	"	—	2.91	"	"	"	"	"	"

Es de remarcar, el descenso en el tenor en alcohol a partir del noveno día. Esto es debido a que, a partir de ese momento, habiendo agotado la levadura el azúcar fermentescible disponible, la producción de alcohol cesa y no compensa más las pérdidas de alcohol por evaporación y consumo por la propia levadura.

Cualquiera sea la cantidad de alcohol formado, es bastante importante durante la fase activa de la transformación y ciertamente la acción antiséptica de esta sustancia influye para descartar del ensilado, numerosas especies microbianas, como lo veremos más adelante. Esta cantidad sin embargo, es insuficiente para esterilizar el ensilado. Si se agrega alcohol hasta tener unos cinco grados alcohólicos, a una masa de pescado y melaza donde las bacterias de putrefacción han hecho ya su aparición se retarda simplemente la marcha de aquélla, pero no se impide.

Se podría pensar también, para explicar la conservación del ensilado, en un poder antibiótico de la levadura *S.p.p.* sobre las bacterias de la putrefacción.

Para aclarar esta duda, aislamos varias especies de microbios putrificantes de la carne de pescado en descomposición y los sembramos formando rayas paralelas en la superficie de gelosas nutritivas y perpendiculares a una raya principal formada por siembra de levadura *S.p.p.*

En 48 horas microbios y levaduras se habían desarrollado y no se notaba ninguna zona de inhibición de las bacterias en proximidades de la raya de levadura, como hubiere sucedido en el caso de que la levadura tuviese un poder antibiótico frente a las diversas cepas de microbios putrificantes ensayados.

La conservación del ensilado de pescado no es pues, debida a una secreción de sustancias antibióticas por la levadura.

Como por otra parte, no se le puede atribuir enteramente al poder protector de la melaza, ni al alcohol producido por la levadura, nos vemos impulsados a relacionarla con la acidez que se desarrolla en la masa pescado-melaza, durante el proceso de fermentación. Reproducimos aquí, en apoyo a esta hipótesis, la sucesión de pH obtenidos:

Tiempo en días	0	2	4	8	11	14	16	18
pH .....	6,5	6,2	5,2	4,9	4,9	5,0	5,1	5,1
Acidez química (grs. de Ac. Sulf. por 100 grs. de mezcla)	0,13			0,68	0,86	0,86	0,93	0,91

Podría preguntarse, de donde viene esta acidez. De la levadura proviene sólo en una débil proporción y veremos, en efecto, la sucesión de pH y las variaciones de la acidez química en una masa esterilizada de pescado más melaza sembrada con la levadura *S.p.p.* pura:

Tiempo en días	0	2	4	8	11	14
pH .....	6,5	6,1	6,0	5,8	5,7	5,8
Acidez química .	0,15	0,38	0,55	0,60	0,90	0,83

Si la acidez proviene sólo en débil proporción de la levadura, debe atribuirse entonces a otros microorganismos que aparecen en el curso del proceso. El Prof. Bertullo ha notado la presencia casi constante, después de algunos días de iniciada la preparación del ensilado, de dos bacterias: una alargada, Gram positiva, que ha designado con la letra "Y" y otra bacteria, corta y muy abundante, igualmente Gram positiva, que provisoriamente la distingue con la letra "Z".

El Prof. Bertullo nos ha confiado cultivos puros de la bacteria "Z" y hemos podido constatar que se trata de un fermento láctico muy enérgico.

Un dosaje de ácido láctico, hecho sobre ensilado de ocho días, por el método de Espil (3), nos dio 7 grs. 53 de ácido láctico en 100 grs. de ensilado.

Se explica muy bien, en estas condiciones, la buena conservación del ensilado de pescado.

Como confirmación, hicimos experiencias directas, agregando a mezclas de pescado y melaza, cantidades de alcohol y de ácido láctico, semejantes a las que aparecen en un ensilado normal, como consecuencia del metabolismo de los microorganismos activos: levadura y fermento láctico.

La mezcla así preparada puede conservarse varios meses. Al cabo de un cierto tiempo, sin embargo, habiendo desaparecido el alcohol por evaporación puede verse invadida la superficie del ensilado con mohos muy resistentes a la acidez, que consumen la acidez láctica. El pH aumenta pues de valor, allí donde ellos se desarrollan, haciendo posible de nuevo y poco a poco, la vida bacteriana y en consecuencia, la putrefacción de la masa.

Pero, es fácil de impedir esta invasión superficial, recubriendo el ensilado con una fina capa de aceite, por ejemplo.

#### *Como se realiza la Fluidificación del Ensilado*

Los primeros controles químicos que hicimos de la fermentación del ensilado (ver página 3), mostraba solamente, una débil aparición de ácidos aminados: 0gr.147 de nitrógeno-formol por 100 grs. de mezcla pescado-melaza, al cabo de 8 días y 0gr.262 a los 18 días.

Se podría pues suponer, que la fluidificación correspondiera a un proceso de digestión menos completo que la degradación de las materias proteicas hasta el término de los ácidos aminados. Hemos pensado que la proteolisis se hacía principalmente hasta el estado de peptonas y para verificarlo recurrimos al método de Cristol y Puech" (2).

He aquí los resultados logrados con este método, en el control de una fermentación normal de ensilado:

Tiempo en días	Nitrógeno bajo forma de Peptona (gr.1/100 grs. carne pescado)
0	0,07
6	0,24
10	0,81
14	0,85
19	1,00
28	1,13
34	1,13

Se ve que la cantidad de proteínas digeridas hasta el estado de peptona, es importante:  $1.13 \times 6.25 = 7$  grs. 06 para 100 grs. de carne de pescado. Si se admite como tenor medio del pescado en proteínas, 17 por ciento, representa una digestión de  $\frac{7.06 \times 100}{17} = 41.5\%$  de las proteínas presentes.

¿Cuál es la causa de la digestión? Descartamos ante todo, la hipótesis de un fenómeno de autodigestión. El ensilado de pescado se prepara, en efecto, con el pescado entero, es decir, con las vísceras. En esas condiciones es evidente que la masa contiene una pequeña cantidad de diastasas proteolíticas, susceptibles de participar en la fluidificación.

Esta explicación tiene sin embargo, poco valor porque las acciones diastásicas son rápidas. Se debería pues comprobar una fluidificación ya al primer día de la molienda del pescado y en realidad tal cosa no sucede; la fluidificación comienza a manifestarse solamente al cabo de varios días, aun cuando la masa fuese sembrada con la levadura.

Hemos constatado además, que una mezcla de carne de pescado y melaza, no sembrada con levadura pero adicionada de un antibiótico como la tetraciclina y recubierta con aceite para impedir las infecciones superficiales por hongos, es decir, completamente al abrigo de toda infección microbiana, podría conservarse varias semanas sin ninguna fluidificación.

La hipótesis de una autodigestión importante de la carne de pescado en las condiciones en que se hace el ensilado, es pues de rechazar.

Es natural, al contrario, atribuir la fluidificación a los microorganismos que intervienen en la fermentación del ensilado: Levaduras y fermentos lácticos.

También con el método de Cristol y Puech (2), hemos ensayado establecer el rol respectivo eventual de esos microorganismos. Para eso, era necesario hacer actuar separadamente cada una de las especies involucradas, sobre materia prima estéril. Es en estas condiciones, que fueron hechas las experiencias siguientes, sobre tres series de muestras, comprendiendo cada una,

siete frascos de mezcla pescado-melaza esterilizados al autoclave y luego sembrados.

- A) siete muestras con cultivos puros de levadura *S.p.p.*
- B) siete muestras con cultivos puros de bacteria "Z".
- C) siete muestras con una mezcla de cultivos de *S.p.p.* y de "Z".

He aquí los resultados obtenidos:

Tiempo en días	Grs. de N bajo forma de peptona por 100 grs. de pescado		
	Grupo A	Grupo B	Grupo C
0	0,07	0,07	0,07
6	0,22	0,52	0,20
10	0,20	0,42	0,17
14	0,31	0,41	0,22
19	0,30	0,50	0,24
28	0,35	0,63	0,41
34	0,57	0,55	0,39

Se constata en las tres series, que la digestión es débil. Los cuadros D y E corresponden a experiencias análogas a las precedentes, pero donde las siembras iniciales con microbios puros han sido hechas en forma más abundante. Eso explica la mayor rapidez de la digestión al principio, pero las conclusiones son las mismas: las digestiones son débiles.

Tiempo en días	Grs. de N por 100 grs. de carne de pescado			
	Cuadro D (con levadura <i>S.p.p.</i> )		Cuadro E (con levadura <i>S.p.p.</i> más bacteria "Z")	
	N no proteico	N aminado	N no proteico	N aminado
2	0,65	0,14	0,50	0,19
3	0,65	0,38	0,65	0,38
5	0,65	0,52	0,75	0,52
7	0,95	0,57	0,92	0,48
9	0,90	0,38	0,88	0,38
16	0,90	0,57	0,86	0,48
24	0,82	0,48	0,88	0,29

La simple observación visual corrobora, además, los resultados analíticos: las masas de ensilado permanecen compactas como al comienzo de la operación, tal como eran a la salida del autoclave. Sin embargo, la observación microscópica muestra que los microorganismos sembrados se han desarrollado.

La ausencia de fluidificación es atribuible pues, al hecho que la materia prima ha sido esterilizada, lo que no es de sorprenderse, si recordamos que la carne hervida es siempre más difícil de digerir que la carne cruda.

Ante estas dificultades, hemos ensayado resolver indirectamente el problema de la causa de la liquefacción, estudiando primero la acción de la levadura *S.p.p.* sobre otras materias, en vez de pescado.

Las levaduras contienen diastasas proteolíticas y se ha comprobado desde hace tiempo (4) que el jugo de levadura preparado por el método Buchner, por ejemplo, disuelve los coágulos floculentos de materias albuminoides. Claro, que esas diastasas son intracelulares y no salen de las células, lo que explica que las levaduras, en general, no licúen la gelatina de los medios de cultivo sólidos.

Hay sin embargo excepciones y se admite, para explicarlas, que las endoproteasas de levaduras son susceptibles, en ciertas condiciones, de difundir a través de la membrana celular.

Uno de nuestros ensayos ha sido buscar si la levadura *S.p.p.* licúa la gelatina. Efectivamente, se constata que en los cultivos por picadura, la gelatina se licúa al cabo de algunos días. El fenómeno comienza a manifestarse aproximadamente, el quinto día y va acentuándose con el tiempo.

• Efectuamos también dosajes químicos a diferentes intervalos, sobre cultivos de levadura *S.p.p.* en medio gelatinado, para apreciar el grado de digestión proteica. Los dosajes fueron hechos, como los precedentes, por el método de Cristol y Puech (2).

Haremos la descripción de una de esas experiencias.

El medio empleado fue el siguiente:

Agua de raicillas de malta .....	1 litro
Sacarosa .....	50 gramos
Gelatina .....	20 gramos

Se repartió en una serie de frascos tapados con algodón, a razón de 100 c.c. en cada uno, que se esterilizaron al autoclave.

Una mitad de la serie fue guardada como testigo y la otra sembrada con 2 c.c. de un cultivo de *S.p.p.* de 24 horas, por frasco.

Se trabajó todo a la temperatura del laboratorio, unos 20°C.

El análisis inicial, hecho sobre uno de los frascos dio:

Nitrógeno peptona	4.55 gr./100 grs. de gelatina
Nitrógeno aminado	1.48 gr./100 grs. de gelatina

Después de 4 días los resultados fueron los siguientes:

Medio sometido a la acción de la levadura <i>S.p.p.</i> ....	{	Nitrógeno peptona:	3.22	gr./100	grs. gelatina
		Nitrógeno aminado:	2.10	"	"
Testigo (medio s/levadura)	{	Nitrógeno peptona:	5.18	"	"
		Nitrógeno aminado:	1.40	"	"

Después de 9 días

Medio sometido a la acción de la levadura <i>S.p.p.</i> ....	{	Nitrógeno peptona:	8.82	"	"
		Nitrógeno aminado:	0.00	"	"

Testigo (medio s/levadura)	{	Nitrógeno peptona:	5.67	"	"	"
	}	Nitrógeno aminado:	1.05	"	"	"
<i>Después de 13 días</i>						
Medio sometido a la acción de la levadura <i>S.p.p.</i> ....	{	Nitrógeno peptona:	6.3	"	"	"
	}	Nitrógeno aminado:	1.4	"	"	"
Testigo (medio s/levadura)	{	Nitrógeno peptona:	6.3	"	"	"
	}	Nitrógeno aminado:	0.7	"	"	"
<i>Después de 19 días</i>						
Medio sometido a la acción de la levadura <i>S.p.p.</i> ....	{	Nitrógeno peptona:	10.8	"	"	"
	}	Nitrógeno aminado:	0.70	"	"	"
Testigo (medio s/levadura)	{	Nitrógeno peptona:	7.7	"	"	"
	}	Nitrógeno aminado:	0.7	"	"	"

De acuerdo a los resultados de los testigos, se ve que la simple esterilización provoca una degradación de la gelatina en peptonas degradación que va acentuándose con el tiempo.

Pero se constata igualmente, que la cifra de peptonas formadas es más importante en los frascos sembrados con la levadura *S.p.p.*, lo que prueba el poder de digestión de esa levadura. Hay un dato de excepción correspondiente al cuarto día, pero el hecho de que en ese momento del cultivo había menos peptonas en el frasco sembrado con *S.p.p.*, que en el testigo, se explica por el consumo de esa substancia, que hace la levadura. En efecto, en ese momento, la levadura está en pleno crecimiento (el desarrollo de la levadura se produce del primero al sexto día aproximadamente).

La levadura *S.p.p.* posee pues, diastasas proteolíticas y esto puede explicar la liquefacción que se constata en el curso de la evolución del ensilado de pescado. Era interesante aportar, a pesar de todo, una demostración directa del poder de digestión de la levadura sobre la carne de pescado, pero para eso, era necesario disponer de pescado estéril y la esterilización por el calor nos estaba prohibida, por la razón ya explicada.

Ensayamos entonces, dos otros medios: rayos ultravioletas y antibióticos.

Como era de prever, teniendo en cuenta la absorción casi completa de la radiación ultravioleta en la superficie de la masa tratada, la acción antibiótica de esos rayos resultó insuficiente, aun operando sobre capas muy finas de materia.

Por el contrario, obtuvimos buenos resultados con los antibióticos habiendo ensayado aureomicina, tirotricina y tetraciclina.

Se sabe que esos antibióticos no actúan sobre las levaduras; se puede pues, recurriendo a ellos, obtener exclusivamente el desarrollo de la levadura sobre la mezcla pescado-melaza no esterilizada.

La tetraciclina es la que nos ha dado los mejores resultados y he aquí una experiencia realizada con este antibiótico: la masa de pescado y melaza fue adicionada de 0,1 por ciento de tetraciclina, dejada 4 horas a la temperatura del laboratorio y luego sembrada con un cultivo puro de levadura *S.p.p.* Al mismo tiempo, se preparó un testigo, constituido por la misma mezcla pescado-melaza, sembrado con *S.p.p.* pero desprovista de tetraciclina. La temperatura media del laboratorio durante la duración de los ensayos fue de 23°C.

Al cabo de 11 días, la masa estaba notablemente fluidificada y el control químico daba los resultados siguientes, referidos a 100 gramos de carne de pescado:

Producto	Tiempo en días	pH	Nitrógeno bajo forma de peptona
Ensilado común	0	6,3	0,10 grs.
	11	5,8	1,39 "
Ensilado en presencia de tetraciclina	0	6,3	0,10 grs.
	11	6,2	1,26 "

En ningún momento hubo desarrollo de bacterias en el lote con tetraciclina. La levadura *S.p.p.* actuando sola, ejerce pues netamente, una acción proteolítica sobre la carne de pescado adicionada de melaza. Se notará sin embargo, que el pH casi no ha variado en el curso de la experiencia y por otra parte, la cifra de peptonas obtenida es inferior a la proporcionada por el ensayo sin antibiótico.

Nos hemos visto impulsados entonces, a estudiar si no hay otras causas de digestión de la carne de pescado, que la acción de la levadura *S.p.p.* en un ensilado común.

Es lógico pensar que esas causas, si existen, deben estar relacionadas con los fermentos lácticos que se desarrollan espontáneamente junto a la levadura en un ensilado común, puesto que la diferencia entre las dos series que venimos a estudiar, está en la ausencia de fermentos lácticos en la masa adicionada de tetraciclina.

El cuadro de la página 10 mostraba además, que en un ensilado realizado con la bacteria "Z" sola, había una digestión débil, pero neta. Esta digestión es debida en parte, quizás a la acción de diastasas proteolíticas segregadas por el microbio. Pero lo cierto es, que el solo ácido láctico formado por las bacterias, produce una digestión importante, como lo demuestra la experiencia siguiente, donde se ha buscado obtener, sin microorganismos, las condiciones químicas de un ensilado; es decir, la presencia de alcohol y ácido láctico.

Se prepararon tres series de 200 gramos de la mezcla pescado-melaza habitual. La primera fue adicionada de 200 miligramos de tetraciclina, para impedir todo desarrollo bacteriano; a la segunda, se le agregó 10 cms. cúbicos de alcohol a 96° G.L. y a la tercera, 10 centímetros cúbicos de alcohol a 96° y 7 gramos de ácido láctico.

En la superficie de todas las muestras, se extendió una fina capa de aceite de vaselina, para impedir la infección por los mohos provenientes del aire.

Al cabo de 18 días, el examen microscópico revela que las tres muestras han quedado estériles, pero mientras las series 1 y 2 quedaron sólidas, la 3 se fluidificó exactamente como un ensilado normal. El análisis químico muestra, por otra parte, que esta última serie tiene 0,57 de nitrógeno soluble, bajo forma de peptonas, por 100 de carne de pescado.

Se puede concluir, de acuerdo a este ensayo, que el ácido láctico ejerce a la temperatura ordinaria, un efecto no despreciable de digestión sobre la carne de pescado.

Y como conclusión general, podemos decir que la fluidificación que se constata en un ensilado normal proviene, en parte, de un efecto de digestión realizada por la levadura *S.p.p.* y por otra parte, de una hidrólisis parcial provocada por el ácido láctico resultante del desarrollo de bacterias lácticas.

#### *Ensayos con otras Levaduras*

El Prof. Bertullo había ensayado para la preparación del ensilado de pescado, algunas otras levaduras además de la *S.p.p.* sin obtener resultados satisfactorios. Nosotros extendimos estas experiencias a 15 levaduras de orígenes muy diversos, pertenecientes a la colección del laboratorio de Pando.

Son las siguientes:

- Nº 4 — Levadura de sidra
- Nº 24 — Levadura de vino chileno
- Nº 28 — Levadura de vino francés

- Nº 34 — Levadura de vino francés
- Nº 51 — Levadura de vino tunecino
- Nº 52 — Levadura de vino tunecino
- Nº 54 — Levadura de vino tunecino
- Nº 101 — Levadura de cerveza baja
- Nº 111 — Levadura de cerveza alta
- Nº 139 — Levadura de cerveza baja
- Nº 141 — Levadura de destilería de granos
- Nº 150 — Levadura de destilería de remolacha
- Nº 159 — Levadura de destilería de melaza
- Nº 160 — Levadura de destilería de melaza
- Nº 161 — Levadura de panadería

No hay en el grupo elegido, levaduras de velo.

Como la *S.p.p.* son todas buenas levaduras de fermentación.

Entre estas levaduras, fue hecha una primera selección sobre la base de la existencia de un poder proteolítico, determinado por una prueba de liquefacción de la gelatina.

A ese efecto, las especies precedentes fueron sembradas en picadura, en el medio gelatinado siguiente:

Agua de raicillas de malta . . . . .	1 litro
Sacarosa . . . . .	50 gramos
Gelatina . . . . .	120 gramos

Con alguna levadura, comenzó a manifestarse una cierta fluidificación alrededor del octavo día; con otras, hubo que esperar más de quince días y finalmente, seis de ellas no dieron ni trazas de fluidificación, siendo eliminadas del ensayo.

Las nueve restantes fueron sometidas a una prueba directa sobre ensilado de pescado; se trataba de las levaduras Nos. 28, 54, 101, 111, 139, 141, 159, 160 y 167.

*Ensayo sobre la Carne de Pescado más Melaza de las Levaduras previamente seleccionadas en razón de su poder proteolítico*

Se preparó una serie de frascos conteniendo cada uno 1 kg. de mezcla carne de pescado-melaza y se sembraron respectivamente con cada una de las levaduras seleccionadas anteriormente, dejando dos frascos como testigos. Quedaron todos a la temperatura del laboratorio, oscilante entre 20 y 23°C.

Al cabo de una semana, se observó un comienzo de liquefacción en los frascos sembrados con las levaduras Nos. 28, 141, 159 y 160.

Luego de tres semanas, la liquefacción se acentuó aun más en todos esos frascos pero ninguna digestión era aún visible en los sembrados con las levaduras Nos. 101, 111, 139 y 167; estas levaduras han sido pues eliminadas.

El frasco sembrado con la levadura N° 54 presentaba un comienzo de liquefacción pero el examen microscópico reveló que la levadura sembrada había desaparecido y había sido reemplazada por una torula infectante. Teniendo en cuenta su falta de resistencia, eliminamos también la levadura N° 54.

La torula infectante apareció también en los frascos sembrados con las levaduras 101, 111 y 139, anteriormente descartadas por ausencia de digestión. Las levaduras restantes: 28, 141, 159 y 167 fueron sometidas a continuación, a ensayos sistemáticos, pero se comportaron de manera muy irregular: unas veces se desarrollaban bien, otras mal.

Los olores de los ensilados obtenidos eran también muy variables, buenos y malos, y se veía aparecer siempre, junto a las levaduras indicadas, numerosas especies bacterianas entre las cuales hemos encontrado, varias veces, tipos putrefactantes.

Tratamos de mejorar el comportamiento de esas levaduras, practicando numerosos pasajes sobre la mezcla carne de pescado más melaza, con la finalidad de que se acostumbraran perfectamente a esa mezcla y una vez aclimatadas, la invadieran completamente desde los primeros días, como lo hace la levadura *S.p.p.* impidiendo así en gran parte, la aparición de las bacterias putrefactantes.

Pero el resultado fue decepcionante. Al cabo de cinco repiques, la mayor parte de esas levaduras habían desaparecido casi enteramente. Para recuperarlas, debimos recurrir a pasajes sobre medios de enriquecimiento y aislamientos.

Eso muestra bien, que la mezcla carne de pescado y melaza no constituye un medio favorable para esas levaduras.

Además, los pasajes sucesivos no produjeron ninguna aclimatación de las levaduras tratadas: multiplicadas aparte y vueltas a sembrar en masa sobre la mezcla pescado - melaza, sus comportamientos eran tan irregulares como antes y no impedían la contaminación de los ensilados por otros microorganismos, bacterias putrefactantes o mohos.

## DISCUSION

En resumen, ninguna de las levaduras que hemos ensayado parece ser verdaderamente adaptada a la vida sobre mezcla de carne de pescado y me-

laza. La única levadura que nos ha dado resultados constantes ha sido la levadura *S.p.p.* aislada por el Prof. Bertullo de un hígado de pescado.

Es una levadura que presenta una afinidad muy grande por la carne de pescado. Bajo ese aspecto, ninguna de las levaduras que hemos ensayado puede comparársele; ella invade desde el primer día la mezcla pescado - melaza, produciendo una cantidad de alcohol que actúa como antiséptico frente a numerosos mohos y bacterias.

Los fermentos lácticos, por el contrario, soportan fácilmente el alcohol y además, su crecimiento es amenudo exaltado cuando se les hace vivir en presencia de levaduras, hecho atribuido a que las vitaminas indispensables a los fermentos lácticos, son precisamente producidas por las levaduras. Es por eso que, los fermentos lácticos, hacen su aparición desde el tercer día del ensilaje y aseguran el éxito de la operación por el rol importante que juegan en la preservación de la masa y en su fluidificación.

A pesar de todo eso, es posible que la levadura *S.p.p.* sea acompañada algunas veces de bacterias putrefacientes, por ejemplo, o de fermentos acetono-butílicos como lo hemos constatado, aunque muy raramente, siendo debido probablemente al mal estado o a la suciedad del pescado tratado.

Pensamos, pues, que para presentar el máximo de garantías, el ensilado a base de levadura *S.p.p.* debe ser preparado en un material muy limpio, con pescado tan fresco, como sea posible y bajo la dirección de una persona adiestrada, competente.

Un medio muy simple de constatar los microorganismos indeseables, nos es proporcionado por el olor; se trate de bacterias putrefacientes o de fermentos del tipo acetono-butílicos el olor del ensilado en preparación revela inmediatamente su presencia, aún en pequeñas cantidades. En ese caso, sería prudente desembarazarse de las cubas contaminadas.

Pero es de hacer notar que, el lado aleatorio de la fabricación, debido a la falta de esterilización, es compensado ampliamente por otras ventajas del punto de vista alimenticio, porque es evidente que la carne de pescado cruda, en parte hidrolizada por los microorganismos y el ácido láctico, es un alimento muy superior a la carne de pescado cocida, donde las proteínas han sido desnaturalizadas por el calor y numerosos ácidos aminados de importancia vital primordial, han sido destruidos.

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

El proceso consiste en sembrar con una levadura especial, pescado molido adicionado de 20 % de melaza.

La conservación del producto se debe al alto poder osmótico de la me-

laza, al alcohol producido por la levadura y, sobre todo, al ácido láctico formado por los fermentos lácticos que aparecen siempre, a los pocos días de iniciado el proceso y que la presencia de la levadura parece favorecer específicamente.

La fluidificación es debido al poder proteolítico de la levadura y a la acción hidrolizante del ácido láctico. Esta proteolisis se produce principalmente hasta el estado de peptona.

Se compararon quince levaduras (de vino, cervecera, panadería, etc.), con la levadura especial utilizada por el Prof. Bertullo, en cuanto a sus acciones sobre la mezcla pescado-melaza.

Ninguna dio resultados tan uniformes y satisfactorios como dicha levadura.

### SUMMARY

The process of fish silage consist in seeding an special yeast into ground fish, plus 20 % of molasses. The keeping quality of the product is due to the high osmotic power of the molasse, to the alcohol produced by the yeast and principally to the latic acid formed by the lactic ferments, that always appears after some few days of initiation of the process. It seems that the yeast presence is favourable to its growth.

Fluidification is due to the proteolytic power of the yeast and to the hydrolyzing action of the latic acid. This proteolysis is produced principally until the phase of peptone.

Fifteenth yeasts were compared (from wine, beer, dough, etc.) with the special yeast used by Prof. Bertullo in connection with its action over the mixture fish-molasses.

No one gave so uniform and satisfactory results like such mentioned yeast.

### BIBLIOGRAFIA

1. BERTULLO, V. H. y PEREZ HETTICH, F. — An. Fac. de Veterinaria, Montevideo, 6 (4), 141, 1956. Ver también el artículo publicado en el diario "El País", de Montevideo, del 29-XI-1959.
2. CRISTOL y PUECH. — C. R. Soc. Biol. 95, 1401, 1926.
3. ESPIL, A. — Bull. Soc. Chim. 2, p. 1286, 1935.
4. HAHN, M. y GERET, Z. — Ueber das Hefe Endotryptase, Zeitschr, f. Biol. vol. XXII, 1900.