



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

Aprovechamiento de fauna de acompañamiento del camarón y subproductos pesqueros mediante la elaboración de ensilado de pescado

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

M. en C. José Carmen Ramírez Ramírez

Comité tutorial:

Directora de tesis: Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesores: Dr. Sergio Huerta Ochoa
Dra. Arely Prado Barragán

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa.

México, D.F., 13 de febrero de 2009

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana esta incluido en el Padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro **0471-O**”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de SAGARPA-CONACYT **2005-12375**.

Se agradece al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) por la beca de estudios otorgada al M.C. José Carmen Ramírez Ramírez, así como a la Unión Europea por el financiamiento otorgado a través del proyecto **Alfa Polylife** para asistir al curso de Biopolímeros en la Universidad de Concepción en Chile. Asimismo, se agradece al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Nayarit (COCYTEN) por la beca otorgada al M.C. José Carmen Ramírez Ramírez para realizar la escritura de la tesis.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

M.C. JOSÉ CARMEN RAMÍREZ RAMÍREZ.

El día 13 de Febrero de 2009

Directora de tesis:

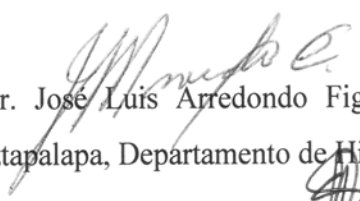
Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.



H. Jurado

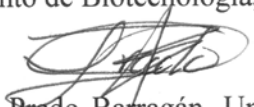
Presidente: Dr. José Luis Arredondo Figueroa, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, Planta de producción acuícola.



Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Planta piloto de fermentación en medio sólido.



Sinodales: Dra. Arely Prado Barragán, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Planta piloto de fermentación en medio sólido.



Dra. Ruth Pedroza Islas. Universidad Iberoamericana, Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas.



Quiero agradecer especialmente a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, por el gran apoyo recibido en la dirección del presente trabajo. Muchas gracias Keiko, por haber creído en mí, por tu amistad, tu ayuda y todas las enseñanzas que me has brindado.

A la Dra. Arely Prado Barragán por sus atenciones y comentarios que siempre me han motivado y la asesoría tan valiosa recibida para realizar el presente trabajo.

Al Dr. Sergio Huerta Ochoa, por su gran gentileza, paciencia y calidad profesional brindada durante la asesoría del presente trabajo.

A la Dra. Ruth Pedroza Islas y al Dr. José Luis Arredondo Figueroa, por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nayarit, institución que me ha permitido realizar mis actividades laborales, agradezco por darme la oportunidad de seguirme preparando.

A la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, institución en la que he aprendido mucho, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP), por haberme otorgado la beca para llevar a cabo esta meta.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para realizar la parte experimental de esta investigación. De igual manera, al Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Nayarit (COCYTEN) por otorgarme la beca para realizar la escritura de la tesis.

Asimismo, agradezco a la Unión Europea el financiamiento otorgado a través del proyecto **Alfa PolyLife** para asistir al curso de Biopolímeros en la Universidad de Concepción en Chile.

De manera muy especial quiero agradecer a la familia Sánchez Ortega: Mi prima Martha y su esposo Fabián, por su gran apoyo incondicional y gracias a esta experiencia compartida he ganado su amistad, la cual me hace sentirlos como mis hermanos. A mis sobrinos Marisol y Fabián, les agradezco mucho por todas las atenciones que me han brindado y los bonitos momentos compartidos.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biopolímeros: Laura Ramírez, Maribel Plascencia, Neith Pacheco, Liliana Barrera, Mari Carmen Marin, Elizabeth Soriano, Zaizi Rocha, Consuelo Gómez, Ara Itzel Pérez, Francisco Hernández Bautista y demás personas que de alguna forma contribuyeron en la realización de este trabajo. Muchas gracias a todos por su ayuda incondicional y los gratos momentos compartidos. Siempre los recordaré con afecto.

DEDICATORIAS

A la memoria de mis padres, Fabián y Abigail, por darme la vida y haberme transmitido los valores que hacen posible la unidad familiar. Todos los bellos momentos compartidos con ustedes me hacen sentirlos presentes y los recordaré eternamente.

Con amor, especialmente a mí querida esposa Estela y mis hijos Aline Isabel, Tania Abigail y Marco Alberto: Por todos sus consejos y el apoyo incondicional que siempre me han dado, lo cual me anima a seguir adelante. Ustedes forman parte de mí en esta meta tan importante, por todos los momentos de alegría, esfuerzo y nostalgia compartidos. Son mi motivo en la vida, los quiero mucho.

A mis hermanos: Pepe[†], Lupita, Concha, Roberto, Guillermo, Francisco y Andrés. Por seguir el legado “*Siempre mantenernos unidos*”. Me siento afortunado y orgulloso de tener hermanos como ustedes. Siempre los seguiré queriendo.

José Carmen Ramírez Ramírez

CONTENIDO

	Pág.
Lista de figuras.....	v
Lista de tablas.....	vii
Abreviaturas acrónimos.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica.....	4
2.1. Producción pesquera nacional e internacional.....	4
2.1.1. Valor nutritivo del pescado.....	4
2.1.2. Subproductos pesqueros.....	4
2.1.3. Fauna acompañante del camarón.....	4
2.1.4. Composición y valor agregado de los desechos pesqueros.....	5
2.1.4.1. Concentrados proteínicos de pescado (CPP).....	6
2.1.4.2. Hidrolizados proteínicos de pescado (HPP).....	6
2.2. Bacterias lácticas.....	7
2.2.1. Definición general.....	7
2.2.2. Clasificación.....	7
2.2.3. Características fermentativas de las bacterias lácticas.....	8
2.2.4. Componentes antimicrobianos producidos por bacterias lácticas.....	8
2.2.4.1. Ácidos orgánicos.....	8
2.2.4.2. Peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono.....	9
2.2.4.3. Diacetilo.....	9
2.2.4.4. Bacteriocinas.....	9
2.3. Probióticos.....	10
2.3.1. Definición.....	10
2.3.2. Bacterias lácticas probióticos.....	10
2.4. Fermentación ácido láctica, importancia y aplicaciones.....	11
2.4.1. Factores que afectan la fermentación ácido láctica.....	11
2.4.1.1. Fuente de carbohidratos.....	12
2.4.1.2. Factores de crecimiento.....	12
2.4.1.3. Anaerobiosis.....	13
2.4.1.4. Temperatura.....	13
2.4.1.5. Concentración de sal.....	13

2.4.1.6. Concentración de ácidos orgánicos y valor del pH.....	13
2.4.1.7. Concentración de dióxido de carbono.....	14
2.4.1.8. Capacidad amortiguadora del sustrato.....	14
2.4.1.9. Número inicial de BAL.....	14
2.5. Ensilaje de pescado.....	15
2.5.1. Definición.....	15
2.5.2. Ensilado químico.....	15
2.5.3. Inconvenientes del ensilado químico.....	15
2.5.4. Ensilado biológico.....	16
2.5.4.1. Ventajas del ensilado biológico <i>versus</i> ensilado químico.....	16
2.5.4.2. Selección de la fuente de carbono.....	17
2.5.4.3. Selección del cultivo iniciador.....	17
2.5.5. Composición química de ensilado de desechos pesqueros.....	18
2.5.6. Hidrólisis de las proteínas (autólisis).....	19
2.5.7. Métodos para determinar el grado de hidrólisis de proteínas.....	20
2.5.8. Ventajas del ensilado de pescado en comparación con harina de pescado.....	20
2.6. Escalamiento de los procesos de fermentación.....	21
3. Antecedentes.....	23
4. Justificación.....	28
5. Objetivos.....	29
6. Hipótesis.....	30
7. Materiales y métodos.....	31
7.1. Establecimiento de las condiciones de fermentación.....	32
7.1.1. Materiales.....	32
7.1.1.1. Desechos de pescado.....	32
7.1.1.2. Fuente de carbono.....	32
7.1.1.3. Cultivo iniciador.....	33
7.1.1.4. Microsilos.....	33
7.1.1.4.1. Microsilos tipo frasco.....	33
7.1.1.4.2. Microsilos de lecho empacado.....	33
7.1.2. Métodos.....	34
7.1.2.1. Selección del nivel de melaza.....	34
7.1.2.2 Selección del tipo de desecho de pescado y microsilos (reactor).....	34
7.1.2.3 Selección del cultivo iniciador.....	34
7.1.2.4. Fermentación en reactor de lecho empacado.....	35
7.1.2.5. Análisis de muestras.....	35
7.1.2.5.1. Determinación de pH y acidez total titulable (ATT).....	35

7.1.2.5.2. Determinación de azúcares solubles totales (AST)...	35
7.1.2.5.3. Determinación de actividad de agua (Aw).....	36
7.1.2.5.4. Análisis estadístico.....	36
7.1.2.5.5. Estimación de la producción de ácido láctico y consumo de azúcares con el modelo de Gompertz.....	36
7.1.2.5.6. Composición química proximal.....	37
7.1.2.5.7. Análisis microbiológico.....	37
7.1.2.5.8. Determinación de α -aminoácidos y grado de hidrólisis.....	38
7.1.2.5.8.1. Preparación de la muestra.....	38
7.1.2.5.8.2. Hidrólisis ácida total.....	38
7.1.2.5.8.3. Medición del grado de hidrólisis.....	38
7.1.2.5.9. Distribución de pesos moleculares de proteínas por Electroforesis (PAGE-SDS).....	40
7.1.2.5.9.1. Extracción de proteínas y determinación de su concentración.....	40
7.1.2.5.9.2. Preparación y corrida de los geles.....	41
7.1.2.5.10. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína.....	41
7.2. Escalamiento de la fermentación a nivel piloto en reactores de columna.....	42
7.2.1. Dimensiones y cantidad de carga de los reactores de columna.....	42
7.2.2. Preparación del cultivo iniciador y el desecho de pescado.....	44
7.2.3. Establecimiento de la fermentación.....	44
7.2.4. Análisis del licor y la fracción sólida.....	45
7.2.5. Análisis de aminoácidos del producto.....	46
7.3. Evaluación del ensilado de pescado obtenido como ingrediente alimenticio para codornices (<i>Coturnix coturnix japónica</i>).....	46
7.3.1. Preparación de las dietas experimentales para codornices.....	46
7.3.2. Evaluación de los parámetros productivos de codornices alimentadas con dietas a base de ensilado de pescado.....	47
7.3.3. Evaluación de rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne de codornices alimentadas con dietas a base de ensilado de pescado.....	48
8. Resultados y discusión.....	50
8.1. Establecimiento de las condiciones de fermentación.....	50
8.1.1. Efecto del nivel de melaza sobre la fermentación.....	50
8.1.1.1. Efecto sobre el pH y producción de ácido láctico.....	50
8.1.1.2. Efecto en la actividad de agua (Aw).....	52
8.1.1.3. Efecto en el consumo de azúcares.....	53
8.1.2. Efecto de la fuente de desecho de pescado y tipo de reactor sobre la fermentación.....	54
8.1.3. Selección del cultivo iniciador.....	60

8.1.3.1. Efecto del tipo de inóculo sobre la evolución del pH.....	60
8.1.3.2. Efecto del tipo de inóculo sobre la producción de ácido láctico y consumo de azúcares.....	61
8.1.3.3. Ajuste de los datos con el modelo de Gompertz.....	63
8.1.4. Fermentación en reactor (microsilos) de leche empacado.....	64
8.1.4.1. Evolución del pH y producción de ácido láctico.....	64
8.1.4.2. Cuenta total de bacterias coliformes y BAL.....	65
8.1.4.3. Cuenta total de bacterias mesofílicas y levaduras.....	67
8.1.4.4. Composición química proximal.....	68
8.1.4.5. Distribución de pesos moleculares de la fracción proteínica...	69
8.1.4.6. Grado de hidrólisis de las proteínas.....	71
8.1.4.7. Digestibilidad <i>in vitro</i> de las proteínas.....	72
8.2. Escalamiento de la fermentación a nivel piloto.....	74
8.2.1. Análisis de licor liberado durante la fermentación.....	74
8.2.1.1. Cambios en el pH y producción de ácido láctico.....	74
8.2.1.2. Cambios en el contenido de azúcares solubles totales.....	77
8.2.1.3. Cuenta total de bacterias lácticas (BAL).....	78
8.2.2. Análisis de la fracción sólida.....	79
8.2.2.1. Valores de pH y ATT.....	80
8.2.2.2. Contenido de azúcares solubles totales.....	81
8.2.2.3. Valores de actividad de agua (A_w).....	81
8.2.2.4. Cuenta total de BAL.....	82
8.2.2.5. Cambios de temperatura durante la fermentación.....	83
8.2.2.6. Rendimiento de licor, producto sólido y ácido láctico.	84
8.2.2.7. Composición química proximal.....	86
8.2.2.8. Grado de hidrólisis y digestibilidad <i>in vitro</i> de la proteína.....	88
8.2.2.9. Contenido de aminoácidos.....	90
8.3 Evaluación del ensilado de pescado obtenido como ingrediente alimenticio para codornices (<i>Coturnix coturnix japónica</i>).....	91
8.3.1. Evaluación de los parámetros productivos.....	91
8.3.2. Rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne.....	93
9. Conclusiones.....	95
10. Perspectivas.....	96
11. Trabajos presentados y publicaciones.....	97
12. Bibliografía.....	99
Anexos.....	109

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Proceso de elaboración de ensilado de pescado por fermentación ácido láctica.....	31
Figura 2.	Microsilos tipo frasco y de lecho empacado usados para establecer las condiciones de fermentación ácido láctica de desechos de pescado.....	33
Figura 3.	Reactores de columna usados para el escalamiento a nivel piloto de la fermentación ácido láctica de desechos de pescado.....	43
Figura 4.	Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado realizada en microsilos tipo frasco, adicionada con 5% (v/p) de <i>Lactobacillus plantarum</i> y diferentes niveles de melaza (p/p).....	51
Figura 5	Producción de ácido láctico durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos tipo frasco adicionada con 5% (v/p) de <i>Lactobacillus plantarum</i> y diferentes niveles de melaza (p/p).....	52
Figura 6.	Cambios en actividad de agua durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado realizada en microsilos tipo frasco, adicionada con 5% de <i>Lactobacillus plantarum</i> y diferentes niveles de melaza (p/p).....	53
Figura 7.	Consumo de azúcares solubles totales durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos tipo frasco adicionada con 5% de <i>Lactobacillus plantarum</i> y diferentes niveles de melaza (p/p).....	54
Figura 8.	Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de diferentes fuentes de desechos de pescado en microsilos tipo frasco adicionada con 5% (v/p) de <i>Lactobacillus plantarum</i> y 18% de melaza (p/p).....	57
Figura 9.	Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de diferentes fuentes de desechos de pescado en microsilos tipo lecho empacado, adicionada con 5% (v/p) de <i>Lactobacillus plantarum</i> y 18% de melaza (p/p).....	57
Figura 10.	Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos tipo frasco, adicionada con 18% de melaza (p/p); o Control (sin inóculo) y 5% (v/p) de iniciador: □ <i>Lactobacillus plantarum</i> , ◇ <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	61
Figura 11.	Producción de ácido láctico durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos tipo frasco, adicionada con 18% de melaza (p/p); o Control (sin inóculo) y 5% (v/p) de iniciador: □ <i>Lactobacillus plantarum</i> , ◇ <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	62
Figura 12.	Consumo de azúcares solubles totales durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos tipo frasco, adicionada con 18% de melaza (p/p); o Control (sin inóculo) y 5% (v/p) de iniciador: □ <i>Lactobacillus plantarum</i> , ◇ <i>Lactobacillus</i> sp. B2...	62

Figura 13.	Evolución del pH y ATT durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos de lecho empacado, adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2. Símbolos: pH (Δ control, ▲ inóculo), ácido láctico (□ control, ■ inóculo).....	65
Figura 14.	Cuentas de bacterias lácticas y coliformes totales durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos de lecho empacado, adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	66
Figura 15.	Cuentas de mesófilos y levaduras totales durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos de lecho empacado, adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	68
Figura 16.	Patrones de proteínas (PAGE-SDS) de ensilados de desechos de pescado.....	70
Figura 17.	Grado de hidrólisis de proteínas en fermentaciones de mezcla de desechos de pescado adicionadas con 18% de melaza (p/p) base húmeda. Símbolos: □ Control e ○ inoculada con 5% (v/p) base húmeda de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	71
Figura 18.	Proteína digestible en pepsina y pancreatina en fermentaciones de mezcla de desechos de pescado adicionadas con 18% de melaza (p/p) base húmeda. Símbolos: Δ Control e ◇ inoculada con 5% (v/p) base húmeda de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	73
Figura 19.	Producción de ácido láctico y cambios de pH en licores de fermentaciones de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	75
Figura 20.	Contenido de azúcares solubles totales en licores de fermentaciones de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	78
Figura 21.	Cuenta total de bacterias lácticas en licor de fermentación de desechos de pescado realizada a nivel piloto en reactor de columna B (13.58 Kg), adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	79
Figura 22.	Comportamiento de la temperatura durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado realizada a nivel piloto en reactores de columna adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	84
Figura 23.	Curva de crecimiento de codornices (<i>Coturnix coturnix japónica</i>) alimentadas con dietas de diferentes niveles de ensilado de pescado.....	92

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Composición química proximal (g/100 g, en base húmeda) de algunos desechos pesqueros.....	5
Tabla 2. Composición química proximal (g/100 g, en base seca) de ensilado de desechos pesqueros obtenidos por fermentación láctica.....	18
Tabla 3. Dimensiones y cantidad de carga de reactores de columna de acero inoxidable utilizados para el escalamiento de la fermentación láctica de desechos de pescado.....	44
Tabla 4. Composición de dietas con diferentes niveles de ensilado de pescado usadas para alimentación de codornices (<i>Coturnix coturnix japónica</i>).....	47
Tabla 5. Valores de pH, acidez total titulable, producción máxima de ácido láctico (P_{max}) y A_w a 96 h en fermentaciones de desechos de pescado adicionadas con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus plantarum</i> usando dos tipos de microsilos.....	56
Tabla 6. Constantes cinéticas estimadas por el modelo de Gompertz para producción de ácido láctico y consumo de azúcares en fermentaciones de desechos de pescado, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de iniciadores: <i>Lactobacillus plantarum</i> y <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	63
Tabla 7. Composición química proximal de desecho de pescado crudo y ensilado a 144 h de fermentación en microsilos, adicionado con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	69
Tabla 8. Valores de pH y acidez total titulable en licores de fermentaciones de desechos de pescado elaboradas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	77
Tabla 9. Análisis de la fracción sólida de fermentaciones de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	80
Tabla 10. Rendimientos de licor y producto sólido de ensilados de desechos de pescado fermentados a nivel piloto durante 165 días en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	85
Tabla 11. Azúcares consumidos y rendimiento de ácido láctico de ensilados de desechos de pescado fermentados a nivel piloto en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	86
Tabla 12. Composición química proximal (%) de desechos de pescado fermentados a nivel piloto en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	87
Tabla 13. Grado de hidrólisis y digestibilidad <i>in vitro</i> de proteínas de desechos de pescado fermentados a nivel piloto en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de <i>Lactobacillus</i> sp. B2.....	89

Tabla 14.	Contenido de aminoácidos (g/100 g de proteína) del ensilado de pescado obtenido en comparación con harina de pescado.	90
Tabla 15.	Composición química proximal de dietas experimentales para codornices (<i>Coturnix coturnix japónica</i>).....	91
Tabla 16.	Efecto del nivel de ensilado de pescado en la dieta sobre conversión alimenticia de codornices (<i>Coturnix coturnix japónica</i>) a diferentes tiempos de experimentación.....	93
Tabla 17.	Efecto de diferentes niveles de ensilado de pescado en la dieta sobre la calidad sensorial de carne de codorniz (<i>Coturnix coturnix japónica</i>).....	93

ABREVIATURAS ACRÓNIMOS

FAC = Fauna acompañante del camarón

SB = Desechos de barracuda mexicana *Sphyræna ensis*

MD = Mezcla de desechos de varias especies de pescado

BAL= Bacterias Acido Lácticas

SDS-PAGE = Gel de electroforesis en poliacrilamida usando dodecilsulfato de sodio

KDa = Kilo Dalton

GHP = Grado de hidrólisis de proteína

TNBS = Acido trinitrobencensulfónico

DP = Digestibilidad *in vitro* de proteína

CPP = Concentrados proteínicos de pescado

HPP = Hidrolizados proteínicos de pescado

FMS = Fermentación en medio sólido

FML = Fermentación en medio líquido

ATT = Acidez total titulable

AST = Azúcares solubles totales

A_w = Actividad de agua

V_{max} = Velocidad máxima de producción de ácido láctico

P_{max} = Producción máxima de ácido láctico

S_{max} = Consumo máximo de azúcares

Y = Rendimiento de ácido láctico = P_{max}/S_{max}

RESUMEN

Los desperdicios del pescado representan una fuente valiosa de nutrientes; sin embargo, muchas veces estos son subutilizados y desechados causando pérdidas económicas y problemas ambientales. El presente estudio consistió en la recuperación y aprovechamiento de desechos de pescado para producir ensilados mediante fermentación ácido láctico, con la finalidad de aumentar la hidrólisis proteínica y valorar el producto en la alimentación animal.

Las condiciones de fermentación fueron establecidas al evaluar tres fuentes de desecho de pescado: fauna acompañante del camarón (FAC), desechos de barracuda mexicana (*Sphyraena ensis*) (SB) y una mezcla de desechos del procesamiento de varias especies de pescado (MD). Además, fueron evaluadas tres concentraciones de melaza (6, 12 y 18% p/p, base húmeda) como fuente de carbono, dando 18% la mejor acidificación con valores de pH y ácido láctico de 4.33 y 0.47 mmol/g, respectivamente.

La concentración máxima de ácido láctico (P_{max}) fue significativamente mayor con *Lactobacillus* sp. B2 (0.54 mmol/g) que con *Lactobacillus plantarum* (0.48 mmol/g). Asimismo, (MD) fue seleccionada para el escalamiento del proceso a nivel piloto e inoculada con *Lactobacillus* sp. B2 (5% v/p, base húmeda), debido a la incrementada producción de ácido láctico y mayor disponibilidad, comparada con las otras fuentes de desechos de pescado.

El escalamiento se realizó en reactores de columna de acero inoxidable que constan de dos módulos, el de la parte superior es utilizado para colocar la mezcla a fermentar y el de la parte inferior sirve para recolectar el licor producido durante la fermentación. Como criterio de escalamiento fue usada similitud geométrica. Se comprobó que el tamaño y cantidad de carga del reactor tuvieron efecto significativo ($P < 0.05$) en la acidificación, siendo ligeramente menor al aumentar el tamaño y carga, lo cual fue observado durante el transcurso de la fermentación. No obstante, los ensilados obtenidos se conservaron en buen estado durante 150 días debido al ácido producido y la reducción en A_w (0.94), lo cual estuvo relacionado con la disminución de las bacterias coliformes en tres ciclos logarítmicos llegando a 1.5×10^2 ufc/g y manteniéndose constantes hasta el final de la fermentación. Esto último también estuvo

relacionado con el incremento de las bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales alcanzaron en promedio 9.88 ciclos logaritmos (8.3×10^9 ufc/g) al llegar a la fase estacionaria.

El patrón electroforético PAGE-SDS mostró que con la adición de inóculo, la proteína de los ensilados sufrió mayor hidrólisis, resultando péptidos con pesos moleculares de 7 hasta 147 kDa. Asimismo, el grado de hidrólisis (GH) de proteína en los ensilados (85.92%) fue significativamente más alto que el de MD cruda (12.20%). Además, la digestibilidad *in vitro* de proteína del ensilado (81.40%), también fue mayor que el de (MD) sin fermentar (69%).

Para estimar el valor biológico del ensilado de pescado, se realizó un ensayo de alimentación con 160 codornices para producción de carne (*Coturnix coturnix japónica*) de 21 días de edad y 78.06 ± 3.96 g de peso. Fueron preparadas cuatro dietas isoproteínicas para crecimiento con diferentes niveles de ensilado de pescado (0, 5, 10 y 15%), las cuales fueron aplicadas en cuatro repeticiones con diez codornices cada una.

Las dietas fueron aceptadas satisfactoriamente por las codornices y los parámetros productivos como el consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia no presentaron diferencia significativa entre tratamientos ($P > 0.05$). Además, el rendimiento de la canal y los atributos de calidad sensorial de la carne de pechuga de codorniz como fueron el color, olor, sabor, blandura y jugosidad, no mostraron diferencia significativa entre el control y las dietas con ensilado de pescado ($P > 0.05$). Asimismo, los panelistas probaron agradablemente la carne sin haber detectado olor ni sabor a pescado.

Los resultados obtenidos demuestran el valor agregado de los desechos de pescado cuando son transformados por fermentación ácido láctico en ensilados con alto grado de hidrólisis proteínica y su importancia en la producción de codornices sin mostrar efectos adversos, así como también podrían ser atractivos para alimentación de otras especies animales.

Palabras claves: Desechos de pescado, melaza, Lactobacillus, fermentación ácido láctica, escalamiento, hidrólisis de proteína, digestibilidad, alimento para codornices.

ABSTRACT

The fish wastes are generally dumped or discarded causing environmental pollution and off odours. However, they represent large resources that are currently underutilized. The purpose of this study was the lactic acid fermentation of three sources of fish wastes: Shrimp by catch (SC), *Sphyraena ensis* wastes (SB) and mixture of fisheries processing wastes from several species (MixW) for production of protein hydrolysates. MixW were added with several sugar cane molasses concentrations as carbon source, 180 g/Kg of sugar molasses gave the fastest acidification.

The maximum concentration of lactic acid (P_{max}) was significantly higher with *Lactobacillus* sp. B2 than that obtained with *Lb. plantarum*. Shrimp by catch (SC), *Sphyraena ensis* wastes (SB) and MixW were evaluated on lactic acid fermentation. MixW was selected for scaling up and inoculated with *Lactobacillus* sp. B2 due to the enhanced lactic acid production and availability. The silage obtained was well preserved due to the acid produced and the reduction in A_w (0.94). The SDS-PAGE electrophoretic pattern showed that using inoculum, the proteins suffered the highest hydrolysis, resulting in peptides with molecular weights from 7 to 147 kDa. The coefficient of protein hydrolysis of silage at 144 h of fermentation was significantly higher (0.94) than the obtained with raw MixW (0.12). The coefficient of protein *in vitro* digestibility (CPD) of silages was also determined higher, 0.88, than the raw MixW (0.69).

The feeding trials with 160 quails for meat production (*Coturnix coturnix japonica*), 21 days old and 78.06 ± 3.96 g of weight each, was carried out in order to assess the biological value of fermented product of fish wastes. Four isoproteic diets for growth were prepared at different levels of fish silage (0, 5, 10 and 15%), which were applied in four repetitions with ten quails each.

Diets were successfully accepted by the quails and productive parameters such as feed intake, weight gain and feed conversion rate did not show significant difference between treatments and commercial diet used as control ($P>0.05$). Moreover, the carcass yield and the attributes meat as the color, odor, flavor, tenderness and juiciness, did not show significant difference between control and the diets with fish silage ($P>0.05$). Also, the panelists tasted pleasantly

the meat without detected any odor or taste of fish. The results reported herein show a high nutritional value and are of interest for the reuse of fishery by-product wastes by industrial sector.

Keywords: Fish waste, molasses, Lactobacillus, lactic acid fermentation, scaling-up, protein hydrolysis, digestibility, animal feed.

I. INTRODUCCIÓN

En México, la actividad pesquera es sumamente importante, en el 2003 se reportó una captura total de 1,564,966 toneladas (Anónimo, 2003). Se producen cantidades importantes de desechos de los procesos de enlatado, desviscerado y fileteado del pescado, que en nuestro país representan aproximadamente 400,000 toneladas, estos están constituidos de piel, cabezas, vísceras, esqueletos y una porción considerable de tejido muscular.

La cantidad de desechos pesqueros anualmente en el mundo varía de 17.9 a 39.5 millones de toneladas (Barroga y col., 2001). Además de estos subproductos, existe una cantidad considerable de especies de pescado pequeñas de mala apariencia y sin valor comercial que acompañan al camarón durante su captura, la cual se denomina fauna acompañante del camarón (FAC). En México se han reportado alrededor de 8,888 toneladas de FAC, que en su mayoría no es utilizada (Anónimo, 2003).

En muchos países, los desechos pesqueros son destinados principalmente a la producción de harina de pescado, siendo una de las principales fuentes de proteína utilizadas en alimentación animal. Sin embargo, además de que el proceso de obtención de harina es altamente contaminante, los precios de la harina de pescado han subido durante las últimas tres décadas y muy probablemente aumenten más con el continuo incremento en la demanda (Li y col., 2004).

En México, una mínima parte de los desechos pesqueros son aprovechados para producir harina y el resto es tirado acarreado problemas graves de contaminación (Barroga y col., 2001). Lo anterior ha fomentado el aprovechamiento de los desechos pesqueros mediante métodos biológicos para recuperar productos con valor agregado (Shirai, 1999).

El ensilaje de pescado es una alternativa para la conservación de los desechos pesqueros que se puede realizar por medio de acidificación directa de los desechos de pescado con ácidos orgánicos, inorgánicos o mezcla de ambos (ensilado químico), o por fermentación (ensilado biológico) con bacterias lácticas que producen ácido láctico *in situ* (Shirai y col., 2001).

El propósito de ambos métodos es bajar el pH del sustrato (pescado o desecho) para inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos y patógenos, evitando así su descomposición. Además, la caída rápida del pH permite mantener los procesos microbiológicos y enzimáticos favorables que ayudan a preservar la buena calidad del ensilado de pescado.

El proceso de producción de ensilado de pescado requiere de poca infraestructura, es más económico, no es contaminante y puede producirse a diferente escala en comparación con la producción de harina de pescado (Dong y *col.*, 1993; Coello y *col.*, 2000).

A diferencia del ensilado químico, el ensilaje de pescado vía fermentación láctica ofrece más ventajas, en particular donde existe disponibilidad de subproductos ricos en carbohidratos como la melaza e incluye tecnología artesanal simple la cual es adaptable a nivel campo (Fagbenro y Jauncey, 1994; Arason, 1994).

El ensilado de desechos acuáticos por fermentación láctica es una fuente valiosa de proteínas, lípidos y minerales que ha sido utilizado exitosamente como suplemento proteínico en alimentos para animales (Plascencia y *col.*, 2002; Vidotti y *col.*, 2002); en la formulación de medios de cultivo (Coello y *col.*, 2002); en la recuperación de quitina (Cira y *col.*, 2002); de pigmentos (Gimeno y *col.*, 2007) y como sustrato para la producción de otros compuestos tales como enzimas (Matsumoto y *col.*, 2004).

Para establecer las mejores condiciones de fermentación, el ensilaje biológico requiere la selección de la fuente de desecho pesquero, de un cultivo iniciador y la fuente de carbono apropiados; así como del nivel necesario para producir suficiente ácido láctico, además de otros metabolitos elaborados por las bacterias ácido lácticas y que en conjunto permitan mantener el producto estable (Van Wyk y Heydenrych, 1985; Shirai y *col.*, 2001; Cira y *col.*, 2002).

Por otra parte, cuando se ha logrado establecer las condiciones de fermentación a nivel laboratorio, el escalamiento es fundamental para predecir con un riesgo mínimo las

condiciones bajo las cuales debe llevarse a cabo el proceso de producción a nivel piloto o industrial.

Dada la demanda actual de fuentes de proteínas con alto valor nutritivo y bajo precio, es necesario el aprovechamiento de los subproductos naturales por métodos económicos y no contaminantes.

Con base a lo anterior, el presente trabajo tuvo como propósito establecer las condiciones de fermentación láctica de desechos de pescado y realizar el escalamiento del proceso a nivel piloto, con la finalidad de obtener ensilados de pescado con alto valor nutritivo para ser evaluados en la alimentación de codornices.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Producción pesquera nacional e internacional.

La pesca es una actividad de gran importancia en el mundo debido al valor que representa desde el punto de vista económico y social. Las cifras que incluyen las capturas, así como también la producción en acuicultura son de 140.47 millones de toneladas a nivel mundial, mientras que para nuestro país se ha reportado una producción total de 1.56 millones de toneladas (FAO, 2004).

2.1.1. Valor nutritivo del pescado.

El pescado es una fuente de proteínas, lípidos, vitaminas y minerales de alto valor nutritivo consumido en todo el mundo. Prácticamente todas las especies de pescado tienen la misma calidad en términos de proteínas; sin embargo, sólo unas pocas de ellas son consumidas usualmente, debido a factores culturales, hábitos alimenticios y otros aspectos tales como apariencia pobre, tamaño inusual y sabor inatractivo. Muchas de las especies capturadas carecen de valor comercial debido a esas consideraciones, pero son igualmente tan nutritivas como las preferidas (Bárzana y García, 1994).

2.1.2. Subproductos pesqueros.

En la industria pesquera se procesa una gran variedad de especies, de las cuales sólo del 40 al 50% representa la fracción comestible. El resto constituye subproductos ricos en proteínas que se pueden transformar en diversos productos útiles. Cuando se capturan peces y moluscos existen numerosas especies entre las capturas que no se consumen como alimento humano, denominados morralla, que puede también transformarse en productos de gran utilidad (Ockerman y Hansen, 1994).

2.1.3. Fauna acompañante del camarón (FAC).

De la producción pesquera mundial, se estima que unos 20 millones de toneladas son descartados en el mar anualmente. De estos 20 millones de toneladas la mayor parte tiene origen en la pesca de camarón tropical; se ha estimado que cada año 9.5 millones de toneladas

de fauna acompañante de camarón (FAC) son devueltos al mar frente a las costas de países en vía de desarrollo, donde la población padece de pobreza y hambre (Cabello y *col.*, 2005).

La FAC incluye a todas las especies de pescado y otros organismos incidentalmente capturados durante las operaciones de arrastre de este crustáceo. La relación FAC/camarón es 5:1 para aguas templadas y de 10:1 para aguas tropicales. Más del 90% del pescado de la FAC pesa menos de 50 g y mide menos de 20 cm; la variación en la composición depende de la zona geográfica, entre otros factores (Cabello y *col.*, 2005).

2.1.4. Composición química y valor agregado de los desechos pesqueros.

Tanto los desechos de la industria pesquera, así como la FAC causan serios problemas ambientales en muchas partes del mundo donde son tirados inadecuadamente. Sin embargo, esos desechos son valiosos porque contienen abundantes biomoléculas tales como proteínas, lípidos, minerales, enzimas y quitinas (Wang y Hwang, 2001). Como puede observarse en la (Tabla 1), los desechos pesqueros presentan un contenido de nutrientes que los hace atractivos para ser utilizados en la elaboración de productos con valor agregado.

Tabla 1. Composición proximal (g/100 g, base húmeda) de algunos desechos pesqueros.

Tipo de desecho pesquero	Humedad	Proteína cruda*	Lípidos	Cenizas
Pescado sin valor comercial de agua de mar ^a	72.65	21.24	1.20	2.75
Pescado sin valor comercial de agua dulce ^a	62.97	18.37	12.55	4.18
Residuos del fileteado de tilapia ^a	68.62	13.49	10.85	5.13
Residuos del fileteado de sardina ^b	71.72	15.48	5.52	4.38

a: (Vidotti y *col.*, 2002).

b: (Zahar y *col.*, 2002).

* = Nitrógeno total X 6.25

Las especies de pescado no comercializables y los desechos pesqueros, frecuentemente adquieren valor cuando son usados para la producción de harina de pescado, concentrados e hidrolizados proteínicos de pescado (Bárzana y García, 1994).

2.1.4.1. Concentrados proteínicos de pescado (CPP).

Un concentrado proteínico de pescado es definido como un producto estable para consumo humano preparado de pescado entero o de otros animales acuáticos o partes de ellos (Bárzana y García, 1994). En este tipo de productos, la concentración de proteína es incrementada por remoción de agua y, en ciertos casos, de aceite, huesos y otros materiales (Finch, 1977). De acuerdo con esta definición, la harina de pescado podría ser considerada en esta categoría.

El potencial de los CPP como aditivo alimentario es limitado en su mayoría debido a que carecen de solubilidad y tienen pobres propiedades funcionales. De modo que, para solubilizar los CPP es necesario degradar la proteína en péptidos de tamaño más pequeño. Ese tratamiento rinde una mezcla de fragmentos proteínicos conocidos como Hidrolizados Proteínicos de Pescado (HPP) (Bárzana y García, 1994).

2.1.4.2. Hidrolizados proteínicos de pescado (HPP).

Durante el proceso de producción de HPP, la depolimerización de proteínas de alto peso molecular ocurre por el rompimiento de enlaces peptídicos por medio de la adición de moléculas de agua. En un medio acuoso, el exceso de agua favorece este proceso lítico y es por lo tanto llamado “hidrólisis” (Bárzana y García, 1994).

La hidrólisis es alcanzada con la ayuda de ácidos, álcalis o enzimas. La hidrólisis ácida causa la destrucción de triptófano y la formación de NaCl seguido de la neutralización, lo cual puede hacer el producto inpalatable; mientras que la hidrólisis alcalina produce el aminoácido lisinoalanina, el cual puede causar envenenamiento a los animales (Raa y Gildberdg, 1982). Contrariamente, la hidrólisis enzimática produce menos subproductos indeseables (Kristinsson y Rasco, 2000).

Los HPP producidos por tratamientos enzimáticos son algunas veces llamados “concentrados biológicos de proteína de pescado”. El proceso es un medio para transformar pescado pelágico barato y desechos del procesamiento de pescado en concentrados proteínicos, los cuales pueden ser usados como sustitutos de leche, suplementos alimenticios y saborizantes de caldos, en vez de ser utilizados en alimentos de bajo valor para animales (Haard y Simpson, 1994).

Un problema que se presenta con los (HPP) es la formación de péptidos hidrofóbicos de sabor amargo, lo cual puede ser evitado a veces con proteasas específicas. Sin embargo, esta parte del proceso incrementa los costos de producción debido a que las enzimas comerciales son caras (Lian y *col.*, 2005).

2.2. Bacterias lácticas.

2.2.1. Definición general.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de microorganismos compuestas por varios géneros con un número de características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. En general las BAL pueden ser caracterizadas como cocos o bacilos Gram-positivos no esporulados, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; los cuales son oxidasa, catalasa y benzidina negativos, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de los carbohidratos (Carr y *col.*, 2002). Este tipo de microorganismos son generalmente utilizadas como cultivos iniciadores en la elaboración de productos lácteos, tales como leche acidificada, yogurt, mantequilla y quesos; así como también en el procesamiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales (Hall, 2002).

2.2.2. Clasificación.

La clasificación de las BAL en géneros diferentes es basada en la morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina. En la naturaleza existen los siguientes

géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Axelsson, 1998).

2.2.3. Características fermentativas de las bacterias lácticas.

Aunque existen diversos géneros de BAL, estas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación. Las homofermentadoras poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de Glucólisis (Embden-Meyerhof). Mientras que, las heterofermentadoras convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr y col., 2002).

2.2.4. Componentes antimicrobianos producidos por bacterias lácticas.

La conservación de alimentos por medio de fermentación con BAL es debida a la inhibición de un gran número de microorganismos patógenos y dañinos por varios productos finales de la fermentación. Estas sustancias son ácidos como láctico y acético, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas y productos secundarios generados por la acción de lactoperoxidasa sobre el peróxido de hidrógeno y tiocianato (Shirai y col., 1996).

2.2.4.1. Producción de ácidos.

La acumulación de ácido láctico y otros ácidos orgánicos producidos por BAL, reduce el pH del ambiente con un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La forma no disociada del ácido orgánico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente; de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo celular. El valor del pKa del ácido orgánico es importante porque las formas sin disociar pueden predominar a un pH por debajo del pKa para cada ácido. Por lo tanto, el ácido acético (pKa 4.76) tendrá mayor actividad antimicrobiana que el ácido láctico (pKa 3.86) (Ouwehand, 1998; Hall, 2002).

2.2.4.2. Peróxido de hidrógeno y dióxido de carbono.

Cuando el oxígeno está presente, las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual puede generar radicales hidroxilo que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos. El dióxido de carbono es un producto final de la fermentación heteroláctica y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos por BAL. El dióxido de carbono promueve un ambiente anaeróbico, reduce el pH y puede ayudar a destruir la integridad de la pared celular microbiana (Hall, 2002).

2.2.4.3. Diacetilo.

El diacetilo es producido por bacterias lácticas que fermentan el citrato y es sintetizado en el metabolismo intermediario del piruvato. Se caracteriza por el aroma a mantequilla que le imparte a productos lácticos cultivados. Se ha mostrado la actividad antimicrobiana del diacetilo a nivel de 200 µg/ml para levaduras y bacterias Gram-negativas y a 300 µg/ml para bacterias Gram-positivas no lácticas (Jay, 1982; Ouwehand, 1998).

2.2.4.4. Bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos o proteínas producidos por muchas bacterias y que presentan actividad antimicrobiana contra otras cepas de bacterias estrechamente relacionadas (Holo y *col.*, 2001). Varias de las bacteriocinas de bacterias Gram positivas son muy potentes, tienen amplio espectro inhibitorio y pueden encontrar uso como agentes antimicrobianos en varias aplicaciones prácticas (Holo y *col.*, 2001; Ray, 2001).

Todas las especies de BAL usadas para producir alimentos fermentados son capaces de producir bacteriocinas, las cuales han atraído gran interés debido a su uso potencial como aditivos seguros no tóxicos en la preservación de alimentos (Klaenhammer, 1988; Holo y *col.*, 2001).

Existen tres clases de bacteriocinas producidas por BAL: 1) lantibióticos; 2) péptidos pequeños hidrofóbicos estables al calor (<13,000 Da); 3) proteínas grandes termolábiles (>30,000 Da) (Ouwehand, 1998).

La mayoría de las bacteriocinas producidas por BAL son péptidos pequeños catiónicos e hidrofóbicos y estables al calor (Jack y col., 1995). Entre estas, la nisina es producida por cepas de *Lactococcus lactis* y es uno de los antibióticos mejor estudiados (Ray, 2001).

2.3. Probióticos.

2.3.1. Definición.

Existen varias definiciones de probióticos, pero la más completa de ellas afirma que son “cultivos puros o mezclas de cultivos de microorganismos vivos, que aplicados al hombre o animales aportan efectos benéficos al huésped mejorando las propiedades de la flora nativa” (Torres, 2002).

2.3.2. Bacterias lácticas probióticas.

La mayoría de los microorganismos probióticos pertenecen al grupo de las BAL y son utilizadas por la industria alimentaria en la elaboración de productos fermentados (Torres, 2002; Nousiainen y Setälä, 1998).

Muchas especies de BAL probióticos se caracterizan por ejercer efectos benéficos al mantener la flora intestinal y urogenital normal, aligerar la intolerancia a la lactosa, disminución de incidencia de diarreas, estimulación del sistema inmune, reducción del colesterol sérico, actividad anticarcinogénica y mejoramiento de valor nutricional de los alimentos (Torres, 2002).

Esos beneficios, son producidos por los metabolitos antibacterianos y componentes celulares específicos de varias especies de bacterias intestinales nativas deseables, particularmente *Lactobacillus acidophilus.*, *Lactobacillus reuteri*, así como de varias especies de *Bifidobacterium* y pocas especies de BAL no intestinales, tales como *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, y *Lactococcus lactis* (Ray, 1996, Salminen y col., 1998).

2.4. Fermentación ácido láctica, importancia y aplicaciones.

La fermentación ácido láctica, es uno de los métodos más antiguos para preservar alimentos, que consiste en un proceso microbiano muy complejo en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la microflora predominante (Shirai y *col.*, 1996).

Mediante este proceso, se obtienen productos estables debido a la rápida fermentación láctica anaeróbica, la cual reduce el pH a niveles que inhiben el crecimiento de microorganismos deteriorativos. Además, los diversos alimentos preparados por fermentación láctica tienen como características principales: una mayor vida útil, cambios en propiedades organolépticas, como el sabor y la textura que los hacen más apetecibles, y en algunos casos, mejores en su calidad nutricional (Shirai y *col.*, 1996; Yin y *col.*, 2005).

La fermentación ácido láctica también es aplicable en la recuperación de productos con valor agregado a partir de desechos de mariscos (Shirai, 1999) y en la preservación de subproductos o desechos de origen vegetal y animal con la finalidad de producir alimentos para animales (Martin, 1996).

Durante la fermentación láctica, además del ácido láctico, se producen en menor cantidad otros compuestos como diacetilo, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, los cuales de manera conjunta con la disminución del pH inhiben el crecimiento de microorganismos dañinos y patógenos aumentando la vida de anaquel del producto (Enes Dapkevicius y *col.*, 2000).

2.4.1. Factores que afectan la fermentación ácido láctica.

El éxito en la conservación de alimentos por fermentación ácido láctica depende del rápido crecimiento de BAL y la suficiente producción de ácido láctico, lo cual conlleva a la eliminación de microorganismos competidores debido a valores de pH bajos, además de la acción de otros agentes antimicrobianos. Respecto a lo anterior, los factores principales que influyen sobre el crecimiento de bacterias ácido lácticas y la velocidad a la cual el pH de la fermentación disminuye y los microorganismos competidores son inhibidos son: (i) disponibilidad suficiente de carbohidratos fermentables; (ii) disponibilidad de factores orgánicos e inorgánicos de crecimiento; (iii) anaerobiosis; (iv) temperatura; (v) concentración

de cloruro de sodio; (vi) concentración de ácidos orgánicos y valor del pH; (vii) concentración de dióxido de carbono; (viii) producción de otros compuestos inhibitorios; (ix) capacidad amortiguadora del sustrato; (x) número inicial de bacterias ácido lácticas; y (xi) número inicial de microbios competitivos (Owens y Mendoza, 1985).

Debido a las características de la presente investigación, la información que se describe a continuación esta relacionada con los factores que afectan la fermentación ácido láctica de pescado y desechos pesqueros.

2.4.1.1. Fuente de carbohidratos.

Ya que el pescado es muy bajo en carbohidratos, es necesario añadir alguna fuente de estos sustratos para obtener una buena producción de ácido durante la fermentación. El suero de leche en polvo, azúcar refinada y melaza de caña de azúcar solos o en combinación han sido utilizados para fermentar desechos de pescado (Van y Heydenrych, 1985). Sin embargo, la melaza de caña es una de las fuentes de carbohidratos más utilizadas, debido a su alto contenido de carbohidratos solubles y precio económico (Zahar y *col.*, 2002). Aunque la mayoría de las BAL normalmente requieren carbohidratos fácilmente fermentables para su crecimiento, algunas son capaces de generar energía a partir de L-arginina en presencia de baja concentración de glucosa (Carr y *col.*, 2002).

2.4.1.2. Factores de crecimiento.

Las vitaminas, aminoácidos, minerales y otros factores de crecimiento requeridos por las BAL derivan del tejido y vísceras de pescado y están disponibles por lo general en cantidades suficientes (Owens y Mendoza, 1985). Por lo tanto, los desechos pesqueros son una fuente valiosa de esos nutrientes que pueden ser usados en el cultivo de microorganismos exigentes como son las BAL (Horn y *col.*, 2005).

2.4.1.3. Anaerobiosis.

La disminución del crecimiento de bacterias Gram negativas aeróbicas obligadas y dañinas, depende de la exclusión temprana de oxígeno durante la etapa inicial de la fermentación, antes que las condiciones ácidas sean establecidas. Por otra parte; para evitar el crecimiento de hongos y levaduras, es necesario mantener condiciones anaeróbicas especialmente en la superficie del producto fermentado. Esos microorganismos son capaces de tolerar las condiciones ácidas y su crecimiento puede conducir al agotamiento de ácidos orgánicos y por consecuencia, al aumento en el pH del material fermentado, creando serias implicaciones para mantener la calidad y seguridad del producto (Owens y Mendoza, 1985).

2.4.1.4. Temperatura.

La temperatura puede tener una influencia considerable sobre la composición de poblaciones microbianas y por lo tanto en la estabilidad y características sensoriales de productos fermentados. De modo que, altas temperaturas ambientales pueden acelerar el crecimiento de todo tipo de microorganismos, incluyendo los patógenos, así como también las BAL. En ese sentido, se ha reportado que temperaturas entre 25 y 30°C son suficientes para producir ensilados de pescado por fermentación láctica (Zahar y col., 2002). Por otra parte, la fermentación ácido láctica de desechos de camarón se ha realizado exitosamente manteniendo la temperatura a 30°C (Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002).

2.4.1.5. Concentración de sal.

En la fermentación láctica la adición de sal realiza la doble función de disminuir la actividad de agua de la carne de pescado y ayudar a las bacterias lácticas en su competencia con las bacterias dañinas (Owens y Mendoza, 1985). Recientemente se ha usado 5% de NaCl en fermentación láctica de desechos de sardina con la finalidad de suprimir el desarrollo de bacterias productoras de gas. Los resultados mostraron que la actividad de las BAL fue inhibida bajo esas condiciones (Zahar y col., 2002).

2.4.1.6. Concentración de ácidos orgánicos y valor del pH.

Puesto que las BAL son excepcionalmente tolerantes a los ácidos orgánicos débiles y valores de pH bajos, rápidamente dominan ambientes anaeróbicos ricos en nutrientes y azúcar (Lücke,

1995). Aunque el pH óptimo de crecimiento depende del género; por ejemplo, *Lactobacillus* y *Pediococcus* requieren de un valor menor de 4.5, mientras que *Leuconostoc* crece fácilmente a valores de pH por arriba de 4.5 (Carr y col., 2002). Sin embargo, para la inhibición efectiva de bacterias deteriorativas y patógenas, es necesario que el pH disminuya tan rápidamente como sea posible a valores en los cuales una proporción significativa de ácido este presente en la forma sin disociar. Por ejemplo, el ácido láctico presenta un pKa de 3.87, mostrando su acción inhibitoria a valores de pH por debajo de 4.9 (Axelsson, 1998).

2.4.1.7. Concentración de dióxido de carbono.

Las BAL son tolerantes a ambientes con altas concentraciones de bióxido de carbono, contrariamente a la mayoría de las bacterias que son sustancialmente menos tolerantes. De modo que, la producción temprana de dióxido de carbono en fermentaciones naturales de alimentos por BAL heterofermentativas productoras de gas, puede ser un factor importante en la eliminación rápida de bacterias patógenas y dañinas (Owens y Mendoza, 1985).

2.4.1.8. Capacidad amortiguadora del sustrato.

La conservación de alimentos por fermentación ácido láctica depende del rápido establecimiento de las condiciones ácidas, de modo que los microorganismos dañinos no tengan tiempo para realizar un crecimiento significativo. La velocidad de declive del pH es afectada principalmente por la capacidad amortiguadora del sustrato. En ese sentido, los alimentos ricos en proteínas como el pescado, con alta capacidad amortiguadora, requerirán mayor crecimiento de BAL y producción de ácido para efectuar una caída significativa del pH (Owens y Mendoza, 1985; Faid y col., 1994).

2.4.1.9. Número inicial de BAL.

La concentración de la población y actividad de las BAL presentes inicialmente en el sustrato, son de gran importancia para que suceda rápida y efectivamente la producción de ácido láctico. Aunque las BAL son habitantes naturales del pescado, están presentes en concentraciones bajas, de $10^1/g$ a $10^4/g$. Por lo tanto, el éxito en la conservación de pescado o cualquier otro producto de origen animal por fermentación ácido láctica, depende de la adición de un cultivo iniciador de BAL (Martin, 1996).

2.5. Ensilaje de pescado.

2.5.1. Definición.

El ensilaje de pescado es definido como un proceso de conservación que se puede realizar por acidificación directa del pescado o desperdicios de su procesamiento con ácidos (ensilaje químico), o por fermentación (ensilaje biológico), con bacterias lácticas que utilizan una fuente de carbono para producir ácido láctico *in situ* (Ockerman, y Hansen, 1994; Shirai y *col.*, 2001; Zahar y *col.*, 2002).

Por ambos métodos, se tiene el propósito de producir un suplemento proteínico de alta calidad para animales llamado “ensilado de pescado” que puede ser almacenado a temperatura ambiente por tiempo prolongado, sin reducir su valor nutritivo y calidad higiénica. El ensilado de pescado es un producto de alto valor biológico que presenta una composición química similar a la materia prima usada para su elaboración (Hall, 2002; Vidotti y *col.*, 2002).

2.5.2. Ensilado químico.

Este tipo de ensilado se obtiene cuando al pescado o subproductos pesqueros se les añade algún ácido inorgánico, orgánico o mezcla de ambos, los cuales bajan el pH a valores adecuados para prevenir el crecimiento de organismos dañinos, además de activar las enzimas proteolíticas endógenas que aumentan la hidrólisis proteínica. Los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, fórmico y propiónico han sido usados, ya sea solos o en combinación (Arason, 1994).

2.5.3. Inconvenientes del ensilado químico.

Cuando son utilizados ácidos minerales tales como el sulfúrico, clorhídrico o fosfórico, se requiere bajar el pH a 2 para alcanzar la inhibición microbiana completa. Por otra parte, el alto contenido de cenizas y proteínas del pescado tiene un efecto amortiguador, lo cual aumenta la cantidad de ácido requerido para lograr el valor de pH deseable; además, antes de ser aplicado el producto en alimentación animal se requiere de su neutralización y resulta una concentración de sal elevada que es indeseable desde el punto de vista nutricional (Ockerman, y Hansen, 1994; Arason, 1994).

En caso de ser utilizados ácidos orgánicos como láctico, propiónico, fórmico o acético para la acidificación, no existe aumento en el contenido de cenizas, además no es necesario neutralizar el ensilado antes de utilizarlo en alimentación animal. Sin embargo, estos ácidos son más caros que los inorgánicos lo cual aumenta el precio del producto (Levin, 1994). Además, tanto los ácidos inorgánicos como los orgánicos son corrosivos y difíciles de manejar en volumen (Hall, 2002).

Se ha reportado que el consumo de ensilado elaborado con ácidos inorgánicos puede causar deficiencia de calcio en los animales, entre otros daños. Por otra parte, cuando son utilizados ácidos orgánicos, también pueden causar problemas a los animales; por ejemplo, el desarrollo de úlceras y daño en membranas mucosas por ácido fórmico (Szakács y *col.*, 1988). Contrariamente, el ácido láctico puede ser metabolizado fácilmente por animales como los peces sin causar daño alguno (Dong y *col.*, 1993).

2.5.4. Ensilado biológico.

La producción de ensilado biológico de pescado requiere de una alta concentración de BAL. Además, debido a que el pescado es pobre en carbohidratos, es necesario añadir una fuente de azúcares altamente fermentables en forma de mono o disacáridos para el buen crecimiento de BAL y la producción suficiente de ácido láctico. Lo anterior es recomendable para que la fermentación sea exitosa al obtenerse valores de pH por debajo de 4.5, lo cual permita inhibir el crecimiento de microorganismos nocivos (Enes Dapkevicius y *col.*, 2000).

2.5.4. 1. Ventajas del ensilado biológico *versus* ensilado químico.

Algunas de las ventajas principales del proceso de ensilado biológico en comparación con el ensilado químico son: ahorro económico porque se evita la compra de ácidos; fácil mantenimiento y reproducción del cultivo iniciador; además, es fácil el secado ya que el ensilado de pescado fermentado presenta menor contenido de humedad que el ensilado químico (Martin, 1996). Aunado a lo anterior, desde el punto de vista nutricional, la hidrólisis proteínica que resulta del ensilado de pescado fermentado es menor que en el ensilado producido por adición de ácido. Además, el proceso de fermentación ayuda a estabilizar la

calidad del aceite en el producto, lo cual resulta más atractivo para los animales (Enes Dapkevicius y *col.*, 1998; Kjos y *col.*, 2001).

2.5.4.2. Selección de la fuente de carbono.

Los niveles de ácido láctico en el pescado son insuficientes para bajar el pH a valores que permitan suprimir el crecimiento de bacterias Gram-negativas. Por otra parte, el equilibrio entre la producción de ácido láctico y amonio en el pescado depende de la cantidad de azúcares libres disponibles en el sistema (Hall, 2002).

Por lo tanto, la selección de la fuente de carbono y el nivel apropiado de esta son factores determinantes, ya que el proceso requiere carbohidratos fácilmente fermentables como una fuente de carbono para el crecimiento de las BAL; de modo que, se pueda lograr una excelente acidificación en tiempo corto (Cira y *col.*, 2002).

Entre las diversas fuentes de carbono han sido utilizadas, lactosa (Hassan y Heath, 1987), dextrosa (Lassen, 1994), harina de maíz o tapioca (Fagbenro y Juncey, 1993), melaza de caña de azúcar (Guerouali y *col.*, 1995; Fagbenro y Juncey, 1998; Vidotti y *col.*, 2002; Zahar y *col.*, 2002), sacarosa y lactosa (Enes Dapkevicius y *col.*, 2007), aunque la melaza presenta ventajas por su menor precio y alto contenido de azúcares solubles. Además, la melaza presenta capacidad ligante, y mejora la estabilidad y características sensoriales del ensilado y los alimento en los cuales es incluido (Fagbenro y Juncey, 1998).

2.5.4.3. Selección del cultivo iniciador.

Los microorganismos acidificantes pueden estar presentes en la microflora nativa del pescado, tal y como es reportado por Zahar y *col.* (2002) quienes evitan la adición de cultivo iniciador empleando un alto nivel de melaza (40%), lo cual conlleva a la inhibición de microorganismos dañinos por efecto de presión osmótica y acidificación.

No obstante, la selección y uso de un cultivo iniciador es recomendable y muy importante para iniciar una rápida producción de ácido láctico, lo cual provoca la caída consecuente del pH e inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y dañinas (Hall, 2002).

Además, el ácido láctico provoca cambios en las características sensoriales debido a la desnaturalización de las proteínas musculares (Yin y col., 2005). Por otra parte, la selección del iniciador es fundamental para el control de la fermentación y mejora de la calidad, ya que las BAL varían en su habilidad para estabilizar el ensilado de pescado (Van Wyk y Heydenrych 1985; Shirai y col., 2000; Cira y col., 2002; Vidotti y col., 2002).

En ese sentido, se han considerado algunos tipos de *Lactobacillus* con capacidad para prevenir la oxidación de las grasas, de modo que, cuando es incorporado el ensilado fermentado en dietas para animales aumenta su palatabilidad (Raa y Gildberg, 1982; Enes Dapkevicius y col., 1998). Además, los ensilados inoculados pueden ser una fuente valiosa de probióticos con varios beneficios para los animales (Salminen y Wright, 1998, Jay, 2000).

2.5.5. Composición química de ensilado de desechos pesqueros.

El ensilado de pescado ofrece un gran potencial para utilizar los desechos pesqueros como una fuente de nutrientes en alimentación animal. Sin embargo, el contenido de proteínas lípidos y minerales del ensilado de pescado depende principalmente de la materia prima utilizada para su elaboración (Martin, 1996); aunque por lo general, el ensilado presenta altas concentraciones de estos nutrientes (Tabla 2). Además, el ensilado de pescado presenta valores satisfactorios de aminoácidos esenciales (Espe y col., 1994; Vidotti y col., 2003), así como también elevada digestibilidad de la proteína (Vidotti y col., 2002).

Tabla 2. Composición química proximal (g/100 g, en base seca) de ensilado de desechos pesqueros obtenidos por fermentación láctica.

Fuente de desecho pesquero	Humedad	Materia seca	Proteína bruta	Lípidos	Minerales
Tilapia ^a	66.35	33.65	41.39	11.74	15.30
Pescado comercial ^b	62.54	37.46	44.9	11.32	4.63
Vísceras de pescado ^c	76.10	23.90	58.70	19.70	7.60
Hidrolizado proteínico ^d	69.20	30.80	30.03	15.0	17.65

a: (Fagbenro y Jauncey, 1993).

b: Pescado de agua de mar no apto para consumo humano (Vidotti y col., 2002).

c: (Dong y col., 1993).

d: Producido de ensilado fermentado de desechos de camarón (Plascencia y col., 2002).

2.5.6. Hidrólisis de las proteínas (autólisis).

Durante el proceso de producción de ensilado de pescado, el ácido activa las enzimas endógenas propias del sustrato (pescado o desechos de pescado), las cuales hidrolizan las proteínas. El proceso es llamado “autólisis” y provoca un aumento en la concentración de aminoácidos libres y péptidos, lo cual da lugar a un incremento de la solubilidad (Raa y Gildberg, 1982; Haard y col., 1985).

Cuando el ensilado es producido por fermentación láctica, se ha encontrado que microorganismos del género *Bacillus* spp. son eficientes agentes hidrolizantes pudiendo contribuir en la digestión de las proteínas del pescado (Martin, 1998).

La licuefacción resultante es dependiente de la temperatura, de las especies de pescado utilizadas y su presentación. De modo que, al incrementar la temperatura aumenta el contenido de nitrógeno soluble y si la materia prima no ha sido desviscerada, la velocidad de la proteólisis incrementa (Mackie, 1982; Arason, 1994).

Independientemente del tipo de ensilado, por arriba del 70% del nitrógeno presente será soluble después de una semana si la temperatura de almacenamiento se mantiene cerca de 30°C (Arason, 1994).

Las características del ensilado de pescado son similares a las de salsas de pescado, mostrando licuefacción considerable debido a la autólisis de proteínas, así como también liberación de lípidos, cuando son usadas especies de pescado grasas (Hall, 2002).

Por otra parte, al incrementar la hidrólisis de proteína también aumenta la digestibilidad, lo cual resulta en su mejor aprovechamiento cuando el ensilado de pescado es usado en dietas para animales monogástricos (Espe y col., 1999).

2.5.7. Métodos para determinar el grado de hidrólisis de proteínas.

Debe tenerse presente que durante la hidrólisis proteínica no sucede una sola reacción, sino un conjunto de reacciones simultáneas de rotura de enlaces con distintos grupos cargados en equilibrio, lo que hace muy complejo este tipo de proceso (Guadix y *col.*, 2000).

En ese sentido, se han reportado tres cambios importantes de la proteína nativa durante la hidrólisis enzimática: 1) Principalmente, incremento en el número de grupos ionizables (NH_3^+ , COO^-), hidrofobicidad y carga neta; 2) disminución en el peso molecular de la cadena polipeptídica y 3) alteración de la estructura molecular, permitiendo la exposición de zonas hidrófobas al ambiente acuoso (Mahmoud y *col.*, 1992).

Cuando sucede la hidrólisis de proteínas, el rompimiento de cada enlace peptídico da lugar a la formación de un grupo α -carboxílico, así como también un grupo α -amino (Adler-Nissen, 1994). Una forma de medir la licuefacción de la proteína es por su grado de hidrólisis (GHP), el cual se define como: “la proporción que existe entre el número de enlaces peptídicos rotos mediante hidrólisis y el número total de enlaces peptídicos de la proteína, expresado como un porcentaje” (Ravallec y *col.*, 2001)

Existen varios métodos para medir el GHP, por ejemplo, pH stat, osmometría, contenido de nitrógeno soluble y el método del ácido trinitro-benzeno-sulfónico (TNBS). Este último, es ampliamente utilizado y consiste en un ensayo espectrofotométrico del cromóforo formado por la reacción del TNBS con los grupos α -amino liberados durante la hidrólisis de las proteínas (Adler-Nissen, 1979).

2.5.8. Ventajas del ensilado de pescado en comparación con la harina de pescado.

La harina de pescado es un producto obtenido por tratamiento térmico, secado y molienda del pescado entero o desechos de pescado. Este producto es usado como una de las principales fuentes de proteína en la acuicultura e industrias avícola y porcina, entre otras (Mc Donald y *col.*, 1999).

Debido a que la producción de harina de pescado generalmente implica altos gastos de energía y de capital, el proceso no siempre resulta económico, causando problemas serios de escasez e incremento del precio del producto (Martin, 1996). Por tal motivo, existe una gran demanda de proteínas de alta calidad y bajo precio para ser utilizados en la formulación de alimentos para animales (Li y *col.*, 2004). Una alternativa a la producción de harina de pescado, es el ensilado de desechos pesqueros, lo cual permite recuperar esa fuente valiosa de proteínas adquiriendo un valor agregado (Plascencia y *col.*, 2002).

Las ventajas que ofrece el ensilado de pescado en comparación con la harina son las siguientes (Raa y Gilberg 1982; Dong y *col.*, 1993; Zahar y *col.*, 2002):

- No se pudre, tiene olor fresco a ácido.
- Menos problemas de contaminación.
- La escala de producción se puede variar sin afectar la economía de producción.
- Las necesidades energéticas de producción son reducidas.
- Tecnología simple y de poco capital.
- No requiere infraestructura y equipo costoso.
- Buenas propiedades de almacenamiento.
- Se pueden aprovechar subproductos agroindustriales.

Asimismo, el ensilado de pescado es una opción para el aprovechamiento de los subproductos pesqueros en áreas rurales o lugares aislados donde no es redituable la producción de harina de pescado (Arason, 1994).

2.6. Escalamiento de los procesos de fermentación.

El escalamiento se define como el conjunto de técnicas que conducen a predecir, con un riesgo mínimo, las condiciones bajo las cuales debe de operar un equipo a cualquier escala, mayor o menor, con base a resultados experimentales en la escala disponible. El objetivo final del escalamiento es el de reproducir los resultados experimentales de la escala disponible en la escala que se pretende, respetando un factor de escala, un principio inviolable de similitud y con base a un criterio idéntico en las dos escalas (Cira y *col.*, 2001).

El escalamiento no es un método justo en una sola vía, incluyendo sistemas de escala más pequeño a más grande (*scale-up*), sino también incluye el método reverso, comúnmente llamado *scale-down*. Este último también es valorado para la obtención de información adicional de procesos que se están llevando a cabo y es caracterizado por ser económico, simple y eficiente (Lonsane y col., 1992).

El problema del escalamiento es uno de los de mayor importancia no sólo en fermentaciones sino en la industria en general (Quintero, 1981), siendo en el caso del método *scale-up*, el eslabón crucial en la transferencia de un proceso a escala de laboratorio a un proceso de escala comercial.

En los procesos de fermentación en medio sólido FMS, el proceso de escalamiento es más complicado en comparación con la fermentación en medio líquido FML, debido principalmente a que la FMS implica el uso de varios tipos de biorreactores, intensa generación de calor en la mayoría de los casos y falta de homogeneidad en el sistema (Mitchell y Lonsane, 1992).

El desarrollo de procesos modernos de fermentación microbológica incluye muchos pasos, los cuales han sido agrupados en seis actividades: 1) aislamiento, investigación y selección del microorganismo apropiado; 2) optimización de los parámetros físico-químicos y nutrimentales así como también la estandarización de las operaciones unitarias del proceso a escala laboratorio; 3) estudios de escalamiento y, si es necesario, el diseño y establecimiento de la planta piloto; 4) generación de datos de ingeniería y diseño de la planta comercial; 5) construcción de la planta y la solución de dificultades en ésta y 6) operación regular de la planta para la obtención del producto (Lonsane y col., 1992).

3. ANTECEDENTES

La producción de ensilado de pescado implica una tecnología que no es reciente; sin embargo, en la actualidad se siguen realizando investigaciones orientadas a evaluar los diferentes factores que afectan el proceso, además de su aplicación en la alimentación animal.

La mayoría de los estudios para producir ensilado de pescado han sido enfocados al uso del método químico. Sin embargo, muchos investigadores en el mundo han mostrado gran interés por el método biológico debido a las ventajas que este ofrece.

Entre los diferentes factores que afectan la producción de ensilado biológico de pescado, varias fuentes de carbono han sido utilizadas; por ejemplo lactoseuro, melaza y azúcar refinada, solos o en combinación (Van y Heydenrych, 1985), lactosa (Hassan y Heath, 1986), dextrosa (Lassen, 1994), harina de maíz o tapioca (Fagbenro y Juncey, 1993), sacarosa y lactosa (Enes Dapkevicius y *col.*, 2007).

Debido a su alto contenido energético y bajo costo, la melaza ha sido mayormente empleada para elaborar ensilado biológico de pescado. No obstante, existen varios reportes que difieren en cuanto al nivel óptimo necesario de este subproducto para realizar satisfactoriamente la fermentación láctica de desechos de pescado.

Según Raa y Gildberg (1982), la adición de 10% o más de melaza a menudo es requerida para producir un ensilado estable. Sin embargo, Dong y *col.* (1993), reportaron que un 4% de melaza en combinación con un cultivo iniciador de BAL, fue necesario para obtener resultados exitosos. Así mismo, Fagbenro y Juncey (1995), utilizaron un nivel del 5%; aunque posteriormente los mismos autores (Fagbenro y Juncey, 1998) aplicaron la misma fuente de carbono en una concentración de 150 g/Kg, adicionando 5 ml/Kg de *Lactobacillus plantarum*. Por otra parte, se ha reportado el uso de altos niveles de melaza (40%), sin adición de cultivo iniciador para elaborar ensilado de pescado (Zahar y *col.*, 2002).

Sin embargo, el control de la fermentación requiere el uso de un cultivo iniciador capaz de producir de forma rápida suficiente ácido láctico, lo cual provoca la disminución necesaria del pH para inhibir las bacterias nocivas (Hall, 2002).

En ese sentido, se han probado diferentes cepas de BAL para producir ensilados de pescado, entre las cuales *Lactobacillus alimentarius* y *Lactobacillus plantarum* alcanzaron la mejor fermentación, siendo seleccionado este último para el proceso (Van y Heydenrych, 1985). En otros estudios también se ha utilizado *Lactobacillus plantarum* en combinación con *Streptococcus faecium* (Dong y col., 1993) y como cepa pura (Hassan y Heath, 1987; Fagbenro y Juncey, 1998; Vidotti y col., 2002; Enes Dapkevicius y col., 2007) para aumentar la producción de ácido durante la producción de ensilado biológico de pescado.

Por otra parte, se han evaluado cuatro cepas diferentes de BAL para fermentar desechos de camarón, resultando *Lactobacillus pentosus* y *Lactobacillus* sp. B2 mejores productores de ácido láctico, aunque pequeñas cantidades de ácido acético fueron detectadas en muestras inoculadas con *Lactobacillus pentosus*, por lo que *Lactobacillus* sp. B2 fue seleccionado para establecer las condiciones de la fermentación (Shirai y col., 2001). En estudios posteriores, *Lactobacillus* sp. B2 fue utilizado para escalar el proceso de fermentación de desechos de camarón a nivel piloto (Cira y col., 2002). Sin embargo, a pesar de que *Lactobacillus* sp. B2 fue un acidificante eficiente bajo las condiciones de los estudios mencionados anteriormente, no se ha evaluado su uso en fermentaciones de desechos de pescado.

Además de lo anterior, varias fuentes de pescado y desechos de pescado han sido utilizados para producir ensilados. Por mencionar algunos ejemplos, perca blanca y trucha entera (Hassan y Heath, 1987), tilapia entera (Fagbenro y Juncey, 1998), desechos de salmón (Kjos y col., 2000), desechos del procesamiento de atún (Vizcarra y col., 1999), merluza plateada entera (White y col., 1999), sardina entera y sus desechos (Zahar y col., 2002), pescado no útil para consumo humano tanto de agua dulce como de mar, además de residuos del fileteado de tilapia (Vidotti y col., 2003), macarela azul (Enes Dapkevicius y col., 2007). Sin embargo, existe una variación considerable entre diferentes lotes de ensilado debido al origen del pescado utilizado (Arason, 1994).

Por lo tanto, es fundamental la evaluación de las fuentes de desechos pesqueros existentes en cada zona geográfica, así como también las fuentes de carbono y cultivo iniciador con sus respectivos niveles para establecer las condiciones de fermentación, lo cual es de gran importancia para escalar el proceso.

El escalamiento basado en similitud geométrica es una técnica que trabaja sobre la base de usar las mismas proporciones físicas durante el cambio de escala a plantas piloto e industrial (Lonsane y *col.*, 1992). Este método ha sido usado recientemente con éxito, para escalar a nivel piloto la fermentación ácido láctica de desechos de camarón en un reactor de columna que consta de dos módulos (Cira y *col.*, 2002). Sin embargo, no ha sido evaluado el escalamiento del proceso para producir ensilados de pescado, empleando este tipo de reactor.

El ensilado de pescado es satisfactorio en cuanto al contenido de aminoácidos esenciales, por lo que es recomendable su uso en alimentación animal (Hassan y Heath, 1987; Arason, 1994; Dong, y *col.*, 1993; Vidotti y *col.*, 2003).

Por ejemplo, Hassan y Heath (1987), reportaron que la inclusión de 5 o 10% de ensilado de pescado en el alimento, mejoró la eficiencia alimenticia de pollos para parrilla, en comparación con un alimento control sin ensilado. Por su parte, Espe y *col.* (1992), demostraron que la sustitución de harina de pescado por ensilado de pescado (0, 5, 10, 20, 30 ó 40%) en la alimentación de pollos de engorda, no afectó o mejoró el crecimiento y la eficiencia alimenticia.

También se ha demostrado que una mezcla (ensilado de desechos de atún:sorgo) en una proporción 70:30 puede ser incluida en un 0, 5, 10 ó 15% en el alimento, sin presentar diferencias significativas en la conversión alimenticia y sin efectos adversos en pollos de engorda (Vizcarra y *col.*, 1999).

Asimismo, el ensilado de pescado incluido en la dieta (50 g/Kg) y diferentes niveles de aceite de pescado para alimentar pollos de engorda, mejoró la conversión alimenticia; además,

aumentaron los niveles de ácidos grasos instaurados en la grasa abdominal y en la carne de pechuga de los pollos (Kjos y col., 2000). También reportaron que el ensilado de pescado en gallinas de postura no afectó el consumo de alimento, producción de huevo, composición de ácidos grasos de la yema y color del huevo; sin embargo, al aumentar el nivel de aceite de pescado en el alimento, aumentó la intensidad del color de la yema (Kjos y col., 2001).

En otro estudio fue sustituida la proteína de pasta de soya en 0, 50 ó 75% con ensilado fermentado de viseras de Cachama blanca (*Piaractus brachiponum*) para alimentar cerdos, resultando mejor la sustitución del 50% en cuanto a ganancia de peso y conversión alimenticia; además, el rendimiento de la canal fue de 80% y la grasa dorsal mostró un espesor máximo de 2 cm (Bermúdez y col., 1999). Por otra parte, Kjos y col. (1999), emplearon el ensilado de pescado (50g/Kg) y diferentes niveles de aceite de pescado (2.5, 5.5 ó 9.5%) en la alimentación de cerdos, sin haber encontrado diferencias significativas en el crecimiento y calidad de la canal.

Barroga y col. (2001) por su parte, reportaron que la inclusión de ensilado de pescado en el alimento (8% de la materia seca) para corderos no afectó el consumo de alimento en comparación con otros dos alimentos, uno con harina de pescado y otro con urea.

El ensilado de los desechos pesqueros también ha sido aplicado en acuicultura. Por ejemplo, Fagbenro y Jauncey, (1998) utilizaron el ensilado de pescado en la formulación de dietas para alimentar tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) demostrando que, la materia seca, proteína cruda y energía bruta presentaron valores de digestibilidad mayor que 80%.

Por otra parte, Vidotti y col. (2002) compararon ensilado de pescado producido por digestión ácida con ensilado fermentado al incluirlo en un 30% de las dietas para alimentar juveniles de Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). La proteína del alimento presentó valores de digestibilidad relativamente altos (72.5 - 80.0%), siendo mejor para el alimento con ensilado fermentado.

También se han utilizado hidrolizados proteínicos de desechos de camarón obtenidos por fermentación ácido láctica en alimentación de tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus* L). La sustitución del 10 y 15% de harina de pescado con el hidrolizado de desechos de camarón fue mejor en cuanto a ganancia de peso, peso corporal final, razón de crecimiento específico y conversión alimenticia, en comparación con la dieta control y aquellas con alto nivel de hidrolizado (Plascencia y *col.*, 2002).

Debido al valor nutritivo que representa el ensilado de pescado, también ha sido utilizado como ingrediente en la optimización de un medio de cultivo para producir lisina (Coello y *col.*, 2002).

Es importante destacar la casi ausencia de publicaciones sobre alimentación y nutrición de codornices en los últimos diez años, así como la falta de datos publicados sobre la composición de la canal (Lázaro y *col.*, 2005). Además, es escasa la información publicada sobre el uso de ensilado de pescado en alimentación de codornices. Recientemente Zinudheen y *col.* (2008) incluyeron ensilado biológico de pescado elaborado con desechos de la producción de surimi en dietas para codornices de postura, evidenciando un aumento en la producción total y calidad interna de huevo.

4. JUSTIFICACIÓN

Los desechos pesqueros, a pesar de presentar un gran potencial nutritivo, en muchas partes del mundo son tirados causando graves problemas ambientales y riesgos para la salud humana. En países donde son aprovechados los desechos pesqueros, han sido utilizados principalmente para producir harina de pescado, siendo una de las principales fuentes de proteína empleadas en alimentación animal. Sin embargo, los precios de la harina de pescado han subido continuamente debido a la disminución en la producción global e incremento en la demanda, lo cual ha provocado escasez del producto. Lo anterior ha fomentado la búsqueda de alimentos proteínicos alternativos y económicos para animales.

La conservación de los desechos pesqueros por fermentación ácido láctica ofrece varias ventajas en comparación con la harina de pescado, debido a que implica una tecnología más económica, menos contaminante, se puede realizar a diferente escala y no requiere de gran infraestructura.

El ensilado de desechos acuáticos por fermentación láctica es una fuente valiosa de nutrientes que puede ser usado exitosamente como suplemento proteínico en alimentos para animales, en la formulación de medios de cultivo, en la recuperación de quitina y como sustrato para la producción de compuestos tales como enzimas.

La presente investigación está orientada hacia el aprovechamiento de desechos de pescado para producir ensilados por fermentación ácido láctica, con la finalidad de darles un valor agregado y disminuir los problemas de contaminación. Asimismo, aplicar el producto obtenido en alimentación de codornices con la intención de disminuir los costos de producción.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar un proceso para la obtención de ensilado de pescado mediante fermentación láctica y su escalamiento a nivel piloto para aprovechar especies de la fauna acompañante del camarón y subproductos de la industria pesquera.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de diferentes niveles de melaza sobre la fermentación ácido láctica de desechos de pescado.
- Evaluar la fuente de desecho pesquero y tipo de microsililo (reactor) sobre la fermentación ácido láctica de desechos de pescado.
- Seleccionar el cultivo iniciador para la fermentación ácido láctica de desechos de pescado.
- Establecer las condiciones de fermentación que permitan el escalamiento del proceso de producción de ensilado de pescado a nivel piloto.
- Determinar las características químicas y microbiológicas; además, evaluar el grado de hidrólisis y digestibilidad proteínica del ensilado de pescado obtenido por fermentación ácido láctica.
- Aplicar el ensilado de pescado obtenido en la alimentación de codornices y evaluar su efecto sobre los parámetros productivos, rendimiento de la canal y calidad sensorial de la carne.

6. HIPÓTESIS

- Diferente nivel de melaza, fuente de desecho de pescado, tipo de bacteria láctica y microsilos afectan la acidificación, consumo de azúcares y actividad de agua de los ensilados de desechos de pescado obtenidos por fermentación ácido láctica.
- La fermentación ácido láctica de desechos de pescado puede ser llevada a nivel piloto obteniéndose resultados semejantes a los de escala laboratorio.
- La hidrólisis proteínica de ensilados fermentados de desechos de pescado es diferente debido a la adición de cultivo iniciador y tiempo de fermentación.
- El consumo de alimento con diferentes niveles de ensilado de pescado, afecta los parámetros productivos, rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne en codornices.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de la investigación fue dividido en tres etapas, en la primera fueron establecidas las condiciones de fermentación, las cuales consistieron en seleccionar el nivel de melaza, el desecho de pescado, tipo de reactor y el cultivo iniciador. En la segunda, se realizó el escalamiento del proceso de fermentación a nivel piloto en reactores de columna y en la tercera se hizo un ensayo biológico de aplicación del producto en alimentación de codornices. En la Figura 1 se presenta el proceso de producción de ensilado de pescado.

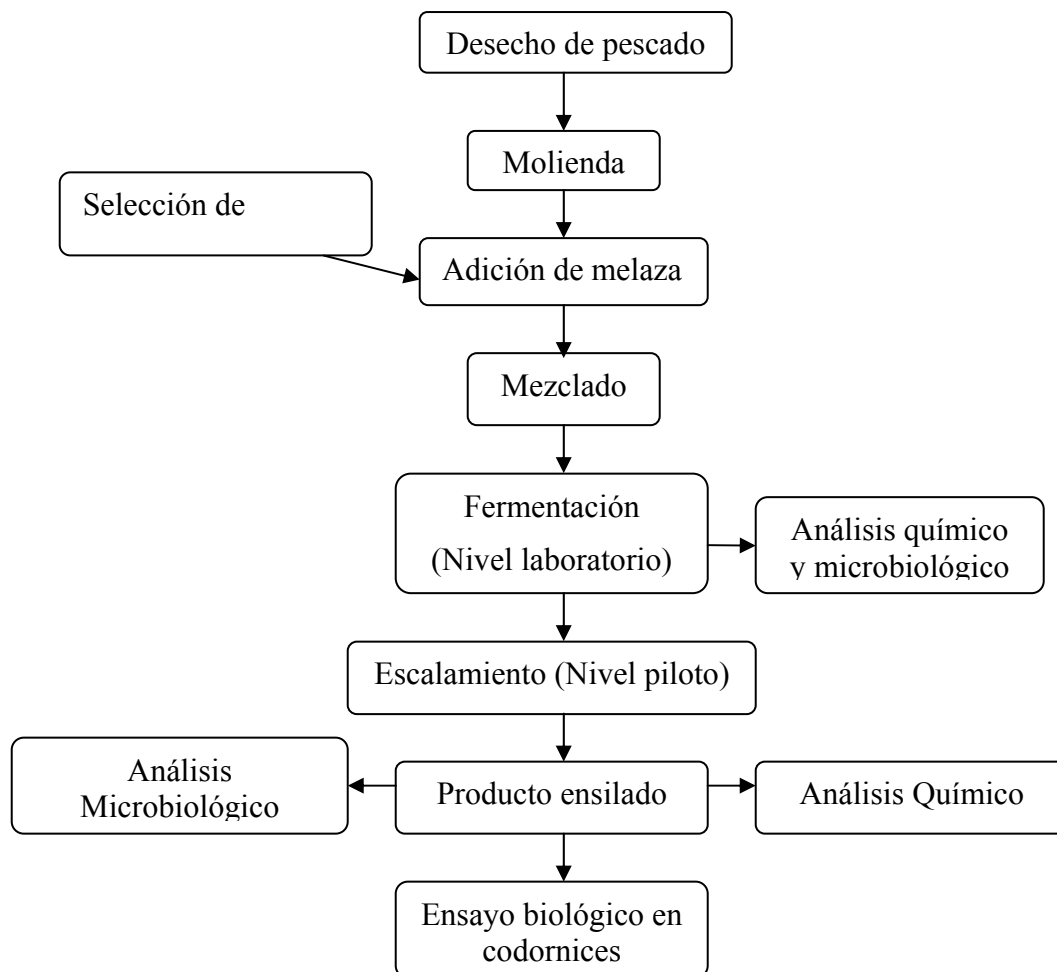


Figura 1. Proceso de elaboración, caracterización y aplicación de ensilado de pescado obtenido por fermentación ácido láctica.

7.1. Establecimiento de las condiciones de fermentación.

7.1.1. Materiales.

7.1.1.1. Desechos de pescado.

El pescado y subproductos pesqueros fueron obtenidos del Puerto de San Blas Nayarit, México. Los desechos fueron molidos en un molino para carne (Marca Torrey, modelo 32-3, México) a un tamaño de partícula de 0.5 cm de diámetro y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Con el objeto de seleccionar la fuente de desecho pesquero, fueron utilizados tres tipos que consistieron en los siguientes:

Fauna acompañante del camarón (FAC).

Formada por especies de pescado entero sin valor comercial capturados en barcos camaroneros en la zona costera del Puerto de San Blas, Nayarit que incluyeron: sardina aleta amarilla, burrito blanco ó roncón (*Haemulon scudderi*), ratón blanco (*Polydactylus approximans*), ratón amarillo (*Polydactylus opercularis*), caballito o papelillo (*Selene peruviana*), ralladito, salmoncillo y chivito.

Subproductos de barracuda mexicana (*Sphyraena ensis*) (SB).

Formados por: cabeza, vísceras, piel, esqueleto y residuos de carne de esa especie.

Mezcla de subproductos de varias especies de pescado (MD).

Esta mezcla de desechos fue obtenida del proceso de fileteado del pescado y consistió de cabezas, vísceras, piel, esqueleto y residuos de carne de las siguientes: *chabelita* (*Peprilis snyderi*), barracuda mexicana, (*Sphyraena ensis*), palometa (*Trachynotus ovatus*), corbina (*Argyrosomus regius*), Chihüil (*Bagre panamensis*) y mojarra (*Diplodus vulgaris*) (Froese y Pauly, 2008).

7.1.1.2. Fuente de Carbono.

Fue utilizada melaza de caña, suministrada por Ingenio el Molino S.A. de C.V. ubicado en Tepic Nayarit, cuya composición química fue determinada de acuerdo a métodos de la AOAC (1990): 25.15% de humedad, 10.37% de cenizas y 55.73% de carbohidratos solubles.

7.1.1.3. Cultivo iniciador.

Para seleccionar el nivel de melaza, fuente de desecho de pescado y tipo de reactor, se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* (APG-Eurozym). Además, para seleccionar el iniciador se hizo la comparación de *Lb. plantarum* con *Lactobacillus* sp. B2, el cual fue aislado de desechos de camarón en investigaciones anteriores (Shirai, 1999). Cada una de las cepas fueron cultivadas en caldo MRS (Man Rogosa and Sharpe) a 30°C durante 24 horas hasta alcanzar una concentración celular de aproximadamente 1×10^9 ufc/ml.

7.1.1.4. Microsilos.

7.1.1.4.1. Microsilos tipo frasco.

Estos consistieron en frascos de vidrio de 5.5 cm de altura y 3 cm de diámetro interior con capacidad de 30 g a los que se adicionaron 20 g de mezcla para fermentar (Figura 2).

7.1.1.4.2. Microsilos de lecho empacado

Fueron utilizadas columnas de vidrio de 20 cm de altura x 2.3 cm de diámetro interior con capacidad de 60 g, las cuales fueron empacadas con 50 g de mezcla. En la parte inferior de la columna se adaptó un tubo de vidrio de 15 cm de altura y 1.5 cm de diámetro interno para recuperar el licor producido durante la fermentación (Figura 2).

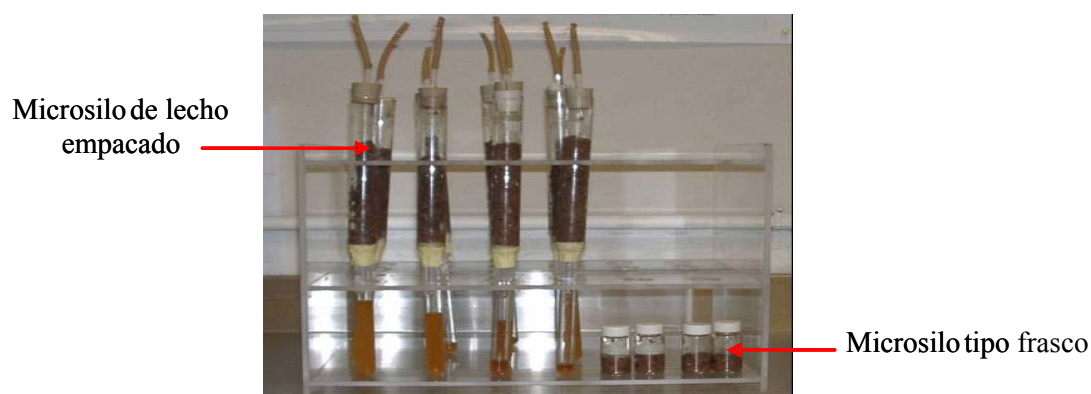


Figura 2. Microsilos tipo frasco y de lecho empacado usados para establecer las condiciones de fermentación ácido láctica de desechos de pescado.

7.1.2. Métodos.

7.1.2.1 Selección del nivel de melaza.

Para llevar a cabo la selección del nivel de melaza, fueron añadidos 6, 12 y 18 g de melaza en base húmeda a cada 100 g de la mezcla de desechos de pescado de varias especies. Como iniciador se adicionó *Lactobacillus plantarum* a una concentración de 5 ml por cada 100 g de mezcla de desechos de pescado (base húmeda) y como control se hizo una mezcla de desechos y melaza a las mismas concentraciones pero sin adición de inóculo.

El mezclado se hizo de forma manual lo más homogéneo posible y se colocaron 20 g de mezcla para fermentar en cada uno de los microsilos tipo frasco. Estos fueron cerrados y se incubaron a 30°C. Se hizo un muestreo por duplicado de los ensilados producidos para cada tratamiento a las 0, 24, 48 y hasta 360 h de fermentación. Las determinaciones realizadas fueron: pH, acidez total titulable (ATT), actividad de agua (Aw) y azúcares solubles totales (AST).

7.1.2.2. Selección del tipo de desecho de pescado y microsilos (reactor).

Este experimento fue diseñado al utilizar las tres fuentes de desechos de pescado: i) FAC, ii) subproductos de barracuda mexicana (SB) y iii) mezcla de subproductos de varias especies (MD) para preparar la mezcla de fermentación. Por cada 100 g de desecho de pescado fueron adicionados 5 ml y 18 g (base húmeda) de *Lactobacillus plantarum* y melaza, respectivamente. Las fermentaciones fueron realizadas en ambos microsilos (frasco y lecho empacado), manteniendo la temperatura a 30°C. Se hicieron muestreos cada 24 h hasta completar 192 h y se determinó pH, ATT y Aw; además, las muestras de licores obtenidas en reactor de lecho empacado fueron analizadas para determinar la distribución de pesos moleculares de proteínas por electroforesis.

7.1.2.3. Selección del cultivo iniciador.

Lactobacillus sp. B2 ha sido utilizado exitosamente en fermentaciones de desechos de camarón (Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002). Sin embargo, no se tienen reportes de fermentaciones de desechos de pescado utilizando esta cepa; por tal motivo, fue utilizada en este experimento para seleccionar el cultivo iniciador.

La mezcla de desechos de pescado de varias especies (MD) fue mezclada con 18% (p/p) de melaza en base húmeda e inoculados con cada uno de los dos iniciadores descritos anteriormente (*Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus* sp. B2) al 5% (v/p) base húmeda. La fermentación se realizó en microsilos tipo frasco manteniendo la temperatura a 30°C y el muestreo se realizó cada 24 h hasta transcurrir 720 h de fermentación. Las determinaciones realizadas fueron pH, ATT y AST.

7.1.2.4. Fermentación en reactor de lecho empacado.

Con la finalidad de aumentar el tiempo de conservación de los ensilados y emplear el iniciador seleccionado en el experimento anterior, fue utilizada la mezcla de desechos de pescado a la que se añadieron 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2. La mezcla fue colocada en microsilos de lecho empacado para llevar a cabo la fermentación a 30°C durante 120 días. Las determinaciones realizadas fueron: pH, ATT, análisis microbiológico, grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de la proteína.

7.1.2.5. Análisis de muestras.

7.1.2.5.1. Determinación de pH y acidez total titulable (ATT).

Las muestras fueron diluidas (1:10) en agua destilada y colocadas en parrilla con agitación magnética para medir el pH usando un potenciómetro (pH 210 HANNA, Italia). Inmediatamente después se determinó la acidez total titulable (ATT) con NaOH 0.1N valorado hasta un pH final de 7.5. La ATT, expresada como porcentaje de ácido láctico fue calculada con la siguiente expresión:

$$\% \text{ ATT} = [(\text{ml de NaOH})(\text{Normalidad del NaOH})(0.09)/\text{g de muestra}] \times 100$$

Posteriormente el porcentaje de ácido láctico fue convertido a mmoles/g.

7.1.2.5.2. Determinación de azúcares solubles totales (AST).

Los azúcares solubles totales presentes fueron determinados por el método del fenol-ácido sulfúrico (Dubois y *col.*, 1956). Para lo cual, 1 ml de la solución que presentaba entre 10 y 90 mg de azúcares fue transferido a un tubo de vidrio con tapón de rosca y se adicionó 1 ml de fenol al 5%. La muestra fue homogeneizada, se añadieron 5 ml de H₂SO₄ concentrado (98%)

y enseguida fue agitada perfectamente en vórtex. La muestra se dejó reposar durante 10 min y la intensidad de la coloración fue medida a 490 nm empleando un espectrofotómetro (JENWAY 6305, UV/Vis., JENWAY, Ltd. Felsted, U.K). La concentración de azúcares solubles totales fue determinada al interpolar los valores de absorbancia obtenidos a una curva estándar para glucosa (Anexo 1).

7.1.2.5.3. Determinación de actividad de agua (Aw).

La actividad de agua (Aw) de muestras sólidas fue medida empleando la técnica de espejo frío (punto de condensación) (AQUALAB CX-2, Labsen Scientific, Co. Home Word IL).

7.1.2.5.4. Análisis estadístico.

Los datos obtenidos a cada tiempo en la cinética de fermentación fueron analizados usando el procedimiento de análisis de varianza (ANDEVA) con el programa NCSS 2001 (NCSS Inc., Kaysville, USA). Para definir el nivel de melaza, así como también el tipo de cultivo iniciador, los resultados obtenidos fueron analizados por separado mediante ANDEVA de un solo factor. Por otra parte, los datos obtenidos de las otras fuentes de variación como lo fueron, tipo de desecho pesquero, tipo de reactor (microsilos) y adición de inóculo, fueron analizados por medio de ANDEVA correspondiente a un arreglo factorial 3 x 2 x 2. La diferencia entre medias fue determinada usando la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer con el pH, ATT, Aw y azúcares solubles totales como variables de respuesta, a un nivel de significancia ($P = 0.05$).

7.1.2.5.5. Estimación de la producción de ácido láctico y consumo de azúcares con el modelo de Gompertz.

El modelo de Gompertz ha sido usado para analizar los datos de producción de ácido láctico en fermentaciones de desechos de camarón (Cira y col., 2002). En la presente investigación el modelo de Gompertz fue usado para estimar la producción de ácido láctico al evaluar el efecto del tipo de desecho de pescado y reactor; así como también para seleccionar el cultivo iniciador. En este modelo tipo logístico, el producto P (ácido láctico) es una función del tiempo t de acuerdo a la siguiente ecuación: $P = P_{\max} \exp(-b \exp(-kt))$

Donde P_{\max} es la concentración máxima de producto (a $t \rightarrow \infty$), b es una constante relacionada a las condiciones iniciales (cuando $t=0$, entonces $P = P_0 = P_{\max} \exp(-b)$) y k es la constante de la velocidad de acidificación. Las constantes P_{\max} , b y k fueron evaluadas con los datos de acidificación usando el programa STATISTICA de estimación no lineal (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). La velocidad máxima de producción de ácido (V_{\max}) fue calculada de los parámetros del modelo Gompertz como $V_{\max} = 0.368 (k)P_{\max}$.

En el caso del experimento realizado para seleccionar el cultivo iniciador, el modelo de Gompertz también fue usado para estimar los parámetros de consumo de azúcares empleando la siguiente ecuación:

$$S = S_{\max} \exp(-b \exp(-kt))$$

Donde S_{\max} es el consumo máximo de azúcares, b es la constante relacionada a las condiciones iniciales y k es la constante de la velocidad de consumo de azúcares. El valor de S fue calculado como la substracción de la concentración inicial de azúcares y la concentración de azúcares al tiempo (t). La velocidad máxima de consumo de azúcares (V_{\max}), fue calculada como $V_{\max} = 0.368(k)(S_{\max})$. Además, el rendimiento de ácido láctico (Y) fue calculado con la siguiente ecuación:

$$Y (\text{ácido láctico/azúcares}) = P_{\max}/S_{\max}$$

7.1.2.5.6. Composición química proximal.

El contenido de humedad, cenizas, proteína cruda, extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno fue determinado empleando los métodos estándar (AOAC, 1990).

7.1.2.5.7. Análisis microbiológico.

Fue estudiada la relación entre el crecimiento microbiano con respecto a la acidificación de los ensilados de desechos de pescado. Para formar diluciones decimales, las muestras fueron homogeneizadas en solución salina isotónica 0.09% de NaCl utilizando un homogeneizador (460003 Sper Scientific) durante tres minutos a 12,000 rpm. El crecimiento microbiano fue determinado por conteo en placa de colonias usando medio de agar para métodos estándar,

eosina azul de metileno, Man Rogosa Sharpe y agar papa dextrosa para: mesofílicos totales, coliformes totales, bacterias ácido lácticas (BAL) y cuenta total de hongos y levaduras, respectivamente (Shirai, 1999).

7.1.2.5.8. Determinación de α -aminoácidos y grado de hidrólisis.

El contenido de α -aminoácidos fue determinado a la fracción sólida de los ensilados usando el método del ácido trinitrobencensulfónico (TNBS) reportado por Benjakul y Morrissey (1997), con algunas modificaciones.

7.1.2.5.8.1. Preparación de la muestra.

Las muestras sólidas obtenidas a diferentes tiempos de fermentación fueron disueltas en buffer de fosfatos 0.2 M y pH 7 en una proporción 2:3 (ensilado: buffer) (Hernández, 2003). La mezcla fue homogeneizada utilizando un homogeneizador (460003 Sper Scientific) durante 1 minuto. Enseguida fue centrifugada a 16,000 x g y temperatura de 4°C durante 10 minutos en una centrífuga refrigerada (Beckman J2-M1, USA) empleando el rotor JA-20 (Serie No. U948885, USA). El sobrenadante obtenido fue usado para determinar el grado de hidrólisis.

7.1.2.5.8.2. Hidrólisis ácida total.

La hidrólisis ácida total se determinó de acuerdo al método reportado por Baek y Cadwallader (1995). En una ampollita de vidrio de 10 ml se añadieron 0.5 ml de sobrenadante obtenido de una suspensión de desecho de pescado crudo y buffer de fosfato 0.2 M con pH 7 en una proporción 2:3. Enseguida se añadieron 4.5 ml de HCl 6 N, la ampollita fue sellada al vacío y se mantuvo a 100°C por 24 h. Posteriormente la mezcla de reacción se neutralizó adicionando 4.5 ml de NaOH 6 N. La muestra hidrolizada fue filtrada a través de papel Whatman No.1 para la remoción de cenizas. Finalmente se determinó el grado de hidrólisis al filtrado por el método de TNBS.

7.1.2.5.8.3. Medición del grado de hidrólisis.

En un tubo ámbar con tapón de rosca y capacidad de 4 ml se colocaron 64 μ l del sobrenadante (obtenido en la preparación de la muestra), más 1 ml de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 8.2) y 0.5 ml de TNBS al 0.01%. La mezcla fue agitada en vórtex durante 10 segundos y se colocó

en baño de agua a 50°C durante 30 minutos bajo la oscuridad. La reacción se detuvo con la adición de 1 ml de sulfito de sodio 0.1 M. La mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6305, UV/Vis., JENWAY, Ltd. Felsted, U.K).

Las muestras analizadas presentaron residuos de melaza, por lo cual, los iones hidroxilo de los azúcares presentes reaccionaron con el TNBS alterando los valores de absorbancia (Adler-Nissen, 1979). Para hacer la corrección de la absorbancia total medida, se prepararon diluciones de melaza a la concentración de azúcares correspondientes para cada muestra de ensilado. Posteriormente se aplicó el método del TNBS antes descrito a las muestras de melaza diluidas para restar la absorbancia registrada a cada uno de los valores obtenidos para los ensilados.

Los valores de absorbancia fueron interpolados en una curva estándar de L-leucina y el resultado fue expresado como concentración mM de grupos α -amino terminal. Para obtener la curva estándar se preparó una solución patrón 6 mM de L-leucina y a partir de ésta se prepararon las siguientes diluciones: 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8, 5.4 y 6 mM (Anexo 2). Cada una de las diluciones fueron analizadas por la técnica de TNBS y los valores de absorbancia obtenidos fueron graficados respecto a la concentración (mM) y ajustados por regresión lineal simple.

El grado de hidrólisis fue calculado usando la siguiente expresión:

$$\% \text{ GH} = [((\text{NH}_2)_{t_x} - (\text{NH}_2)_{t_0}) / ((\text{NH}_2)_{\text{HT}} - (\text{NH}_2)_{t_0})] \times 100$$

Donde:

$(\text{NH}_2)_{t_x}$ = cantidad de grupos α – amino terminal al tiempo t_x de fermentación.

$(\text{NH}_2)_{t_0}$ = cantidad de grupos α – amino terminal en el ensilado al tiempo 0.

$(\text{NH}_2)_{\text{HT}}$ = cantidad de grupos α – amino terminal en el desecho sin fermentar después de una hidrólisis ácida total.

7.1.2.5.9. Distribución de pesos moleculares de proteínas por electroforesis (PAGE-SDS).

La electroforesis de proteínas en gel con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), es sin duda una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. Por medio de esta tecnología pueden realizarse investigaciones que permiten la determinación de peso molecular, pureza de proteínas, modificaciones postraduccionales, estructura de subunidades, actividad enzimática, procesamiento de proteínas y secuencia de aminoácidos, entre otras (Rosenberg, 1996).

7.1.2.5.9.1. Extracción de proteínas y determinación de su concentración.

Para analizar los ensilados al tiempo 0 de fermentación, primeramente se hizo una extracción de proteínas, para lo cual se preparó una mezcla del desecho de pescado crudo (sin fermentar) con agua en una proporción 1:2 (Mackie, 1997). La mezcla obtenida fue homogeneizada durante 1 minuto y enseguida se centrifugó a 16,000 x g durante 10 minutos y temperatura de 4°C empleando una centrífuga refrigerada (Beckman J2-M1, USA) y el rotor JA-20 (Serie No. U948885, USA). Al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad USA), para lo cual fueron tomadas las lecturas de absorbancia a 595 nm utilizando un espectrofotómetro (JENWAY 6305, UV/Vis., JENWAY, Ltd. Felsted, U.K).

Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados a una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA) (Anexo 3). Posteriormente se realizó el análisis de distribución de pesos moleculares mediante la técnica de electroforesis (PAGE-SDS).

Con el propósito de analizar la distribución de pesos moleculares de los péptidos resultantes de la hidrólisis proteínica durante la fermentación, fueron muestreados los licores producidos en los reactores de lecho empacado descritos en la sección 7.1.2.4. El muestreo fue realizado a partir de las 24 h de fermentación y los licores fueron centrifugados a 11,500 rpm durante 10 minutos empleando una micro centrífuga (Bio-Rad Mod. 14 K). Enseguida, al sobrenadante obtenido se le determinó la concentración de proteína por el método de Bradford descrito anteriormente, y se analizó la distribución de pesos moleculares por electroforesis.

7.1.2.5.9.2. Preparación y corrida de los geles.

Para obtener el perfil de distribución de pesos moleculares, se utilizó la técnica de electroforesis (PAGE-SDS) en condiciones desnaturalizantes y reductoras reportada por Laemmli (1970). Se prepararon geles de dodecil sulfato de sodio-poliacrilamida (12%). Para realizar la corrida de los geles se utilizó una cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN^R 3 Cell 8 BIO RAD). En cada poso del gel se inyectaron 15 µl de muestra conteniendo de 5-8 µg de proteína. El marcador estándar utilizado fue una mezcla de proteínas con pesos moleculares de amplio rango (miosina, beta galactosidasa, seroalbúmina bovina, ovalbúmina, anhidrasa carbónica, inhibidor de tripsina de soya, lisozima y aprotinina) con pesos moleculares de 209, 124, 80, 49.1, 34.8, 28.9, 20.6 y 7.1 kDa, respectivamente (BIO-RAD). Los geles obtenidos fueron analizados por densitometría para lo cual se utilizó una cámara Bio-Rad Gel-Doc 100. Posteriormente las imágenes de los geles fueron procesadas con el software ImageJ 2.

7.1.2.5.10. Digestibilidad *in vitro* de la proteína.

Los métodos convencionales utilizados para medir la digestibilidad *in vivo* de los ingredientes alimenticios son muy caros y requieren de largos períodos de incubación, por tal motivo, se han probado métodos *in vitro* que poseen la ventaja de ser simples y rápidos; además, permiten evaluar un gran número de muestras al mismo tiempo y a un menor costo (Capetillo y col., 2001). La digestibilidad proteínica *in vitro* del ensilado de pescado fermentado fue determinada usando el método reportado por (Calsamiglia y Stern, 1995) con algunas modificaciones.

Las muestras de ensilados fueron deshidratadas y se les determinó el contenido de nitrógeno total por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990). Una cantidad de muestra con un contenido de 15 mg de nitrógeno fue colocada en un tubo para centrífuga de 30 ml. Enseguida a cada tubo le fueron añadidos 10 ml de una solución de pepsina (Sigma P-7012, Sigma), (1 g/L) disuelta en HCl 0.1 N (pH 1.9).

La mezcla fue incubada durante 1 h a 38°C con agitación constante. Inmediatamente después, fueron añadidos 0.5 ml de NaOH 1 N y 13.5 ml de una solución de pancreatina (Sigma P-7545, Sigma), (3 g/L) disuelta en buffer de fosfatos 0.5 M y ajustado a pH 7.8. Las muestras

fueron incubadas a 38°C durante 24 h con agitación constante.

Posteriormente, a cada tubo se le añadieron 3 ml de una solución de ácido tricloroacético (TCA) 6.1 N para frenar la acción enzimática y precipitar las proteínas indigestibles. Los tubos con la muestra fueron mezclados y se dejaron reaccionar en reposo durante 15 min. Las muestras digeridas fueron centrifugadas a 10,000 x g durante 15 min en una centrífuga refrigerada (Beckman J2-M1, USA) empleando el rotor JA-20 (Serie No. U948885, USA). El sobrenadante obtenido fue separado para determinar el nitrógeno soluble total por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990) y enseguida se calculó la proteína digestible en pepsina-pancreatina con la siguiente expresión:

$$\% \text{ de proteína digestible en pepsina-pancreatina} = (\text{Nitrógeno soluble en TCA} / \text{Nitrógeno total de la muestra}) \times 100.$$

7.2. Escalamiento de la fermentación a nivel piloto en reactores de columna.

Después de haber definido las condiciones de fermentación en experimentos anteriores, se procedió a llevar a cabo el escalamiento del proceso a nivel piloto en reactores de columna de acero inoxidable. El escalamiento de la fermentación ácido láctica de los desechos de pescado fue realizado aplicando el criterio de similitud geométrica (Cira y col., 2002).

7.2.1. Dimensiones y cantidad de carga de los reactores de columna.

Los reactores de columna utilizados son presentados en la Figura 3. Estos están contruidos de acero inoxidable y contienen dos módulos, el de la parte superior que es utilizado para colocar la mezcla a fermentar y el de la parte inferior que sirve para recolectar el licor producido durante la fermentación.

Entre los dos módulos, cada reactor cuenta con un filtro de acrílico que permitió la separación del licor; además, poseen en toda la longitud entradas para la colocación de termopares y salidas para gas. En el módulo inferior de cada reactor fue conectado un tubo de látex en la parte interna y colocado hasta el fondo, con la finalidad de poder extraer el licor total producido durante cada muestreo para realizar el monitoreo.

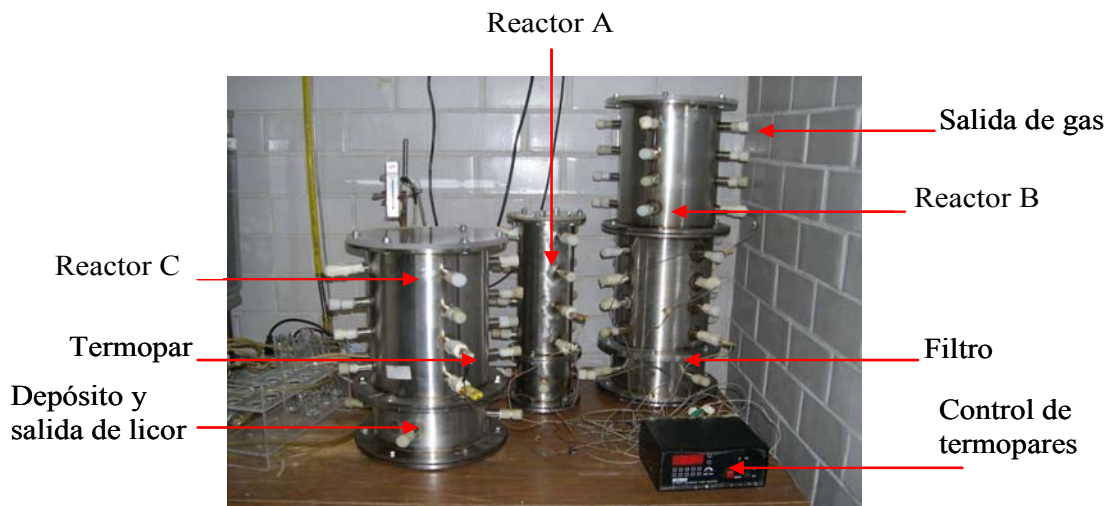


Figura 3. Reactores de columna usados para el escalamiento a nivel piloto de la fermentación ácido láctica de desechos de pescado.

En el caso del reactor chico (A), se hizo una repetición del mismo (A*) habiendo iniciado el proceso al mismo tiempo que los demás reactores. Lo anterior se hizo con la finalidad de suspender la fermentación del reactor (A*) a los 7 días para evaluar la estabilidad del producto sólido a ese tiempo (Tabla 3).

El reactor B presentó dos veces el diámetro del reactor A, así como también la altura de llenado con la mezcla de fermentación, siendo de 20 y 40 cm para los reactores A y B, respectivamente. La cantidad de mezcla de fermentación añadida (carga) se presenta en la tabla 3.

Por otra parte, aplicando el mismo criterio de similitud geométrica y con fines comparativos fue utilizado otro reactor (C) de dimensiones intermedias entre los dos anteriores (Figura 3, Tabla 3) al cual le fue adicionada la mezcla de fermentación a la misma altura que el reactor chico (A) (Tabla 3).

Tabla 3. Dimensiones y cantidad de carga de reactores de columna de acero inoxidable utilizados para el escalamiento de la fermentación láctica de desechos de pescado.

Reactor	Dimensiones* (cm)	Relación (L/D)	Altura de llenado (cm)	Cantidad de mezcla adicionada (Kg)	Volumen ocupado (cm ³)	Densidad aparente (g/cm ³)	Tiempo de fermentación (días)
A (Chico)	10 y 30	2	20	1.96	1571	1.247	165
A** (Chico)	10 y 30	2	20	1.91	1571	1.216	7
B (Grande)	20 y 60	2	40	13.58	12566	1.081	165
C (Mediano)	20 y 30	1	20	6.95	6641	1.089	165

* Diámetro y altura.

** Repetición de fermentación en reactor chico.

7.2.2. Preparación del cultivo iniciador y el desecho de pescado.

Para realizar la fermentación, fue utilizado como iniciador la cepa de *Lactobacillus* sp. B2, la cual fue preparada al tomar una porción pequeña del microorganismo por medio de un asa de siembra y se inoculó en caldo MRS para ser incubado a 30°C durante 24 h. Además, fue utilizada la mezcla de desechos de pescado de varias especies (Sección 7.1.1.1).

7.2.3. Establecimiento de la fermentación.

Tomando en cuenta las condiciones establecidas en experimentos anteriores, la fermentación fue realizada de la siguiente manera.

El desecho de pescado molido, fue mezclado homogéneamente con los demás ingredientes durante 15 minutos en una mezcladora semiindustrial (marca VEYCO, fabricada en México). Los ingredientes fueron adicionados a la mezcladora bajo el orden siguiente: 1) desecho de pescado, 2) melaza de caña de azúcar 18% (p/p, base húmeda) y 3) 5% (v/p, base húmeda) de *Lactobacillus* sp. B2.

La mezcla obtenida fue pesada y transferida a los reactores hasta la altura descrita anteriormente. Inmediatamente después, los reactores fueron cerrados y colocados en un cuarto con temperatura controlada de 30°C.

Con la finalidad de monitorear la temperatura durante el transcurso de la fermentación, fueron colocados termopares distribuidos en el módulo superior de cada uno de los reactores y haciendo contacto con la mezcla de fermentación. Además, para facilitar la salida de gas; las válvulas de la parte superior de los reactores (espacio de cabeza) se dejaron parcialmente abiertas durante los primeros dos días de fermentación.

El total de licor producido en cada uno de los reactores fue colectado diariamente durante una semana y posteriormente por tiempos más espaciados hasta completar 165 días de fermentación. Los licores colectados fueron analizados para evaluar la acidificación del producto durante el transcurso de la fermentación.

Por otra parte, con el propósito de evaluar la estabilidad de la fracción sólida, los tres reactores (A, B y C) fueron destapados a los 150 días de fermentación. En las condiciones más asépticas posibles, la pasta fue agitada y se hizo un muestreo para realizar los análisis correspondientes. Inmediatamente después, los reactores fueron tapados nuevamente y la fermentación se dejó continuar hasta completar 165 días.

Durante el proceso, el peso total de licor y fracción semisólida obtenida en cada muestreo fueron registrados para realizar un balance de masa.

7.2.4. Análisis del licor y la fracción sólida.

Las muestras de licor obtenidas fueron analizadas para determinar pH, acidez total titulable, azúcares solubles totales; y en el caso del licor obtenido del reactor grande (B), también se hizo la cuenta total de bacterias lácticas en placa.

A la fracción sólida, además de las mediciones anteriores, se le determinó la composición química proximal, grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de la proteína utilizando los métodos descritos previamente (Sección 7.1.2.5.). Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente por medio de ANDEVA de un solo factor siguiendo el método descrito previamente (sección 7.1.2.5.4).

7.2.5. Análisis de aminoácidos del producto.

Para determinar los aminoácidos de la fracción sólida del ensilado de pescado obtenido, se utilizó la metodología descrita por Vázquez-Ortiz y *col.* (1995) y los resultados obtenidos fueron expresados en g de aminoácido/100 g de proteína.

7.3. Evaluación del ensilado de pescado obtenido como ingrediente alimenticio para codornices (*Coturnix coturnix japónica*).

7.3.1. Preparación de las dietas experimentales para codornices.

El ensilado de pescado obtenido fue mezclado con pasta de soya en una proporción (1:1), con la finalidad de facilitar el manejo y secado del mismo. La mezcla obtenida fue colocada en charolas de aluminio e introducidas a un horno de laboratorio Marca Felisa a temperatura de 45°C durante 48 horas para llevar a cabo la deshidratación (Fagbenro y Jauncey, 1995).

La mezcla obtenida fue utilizada para preparar cuatro dietas experimentales para desarrollo de codornices con niveles de inclusión de 0, 10, 20 y 30%, lo cual fue equivalente a 0, 5, 10 y 15% de adición del ensilado de pescado, respectivamente (Tabla 4).

Para lograr un tamaño homogéneo de partícula, los ingredientes alimenticios fueron molidos y mezclados adecuadamente. Las dietas fueron ajustadas en cuanto al contenido de proteína, de modo que, todas las codornices recibieron la misma cantidad de proteína para satisfacer sus requerimientos (NRC, 1994).

Las dietas obtenidas fueron analizadas para determinar su composición química proximal (AOAC, 1990).

Tabla 4. Composición de dietas con diferentes niveles de ensilado de pescado usadas para alimentación de codornices (*Coturnix coturnix japónica*).

Ingrediente	Nivel de inclusión de ensilado de pescado (%)			
	Control (0)	5	10	15
Maíz	52.47	52.47	52.47	52.47
Ensilado de pescado: Pasta de soya (1:1)	0	10.00	20.00	30.00
Pasta de soya	40.40	30.40	20.40	10.40
Ortofosfato	1.50	1.50	1.50	1.50
Aceite vegetal	2.80	2.80	2.80	2.80
Calcio (38%)	1.00	1.00	1.00	1.00
Sal refinada	0.30	0.30	0.30	0.30
Novasil plus	0.25	0.25	0.25	0.25
Bicarbonato de sodio	0.18	0.18	0.18	0.18
Metionina	0.11	0.11	0.11	0.11
Px-v10-cod*	1.00	1.00	1.00	1.00
	100.0	100.0	100.0	100.0

* = Premezcla de vitaminas y minerales para codornices en etapa de crecimiento.

7.3.2. Evaluación de los parámetros productivos de codornices alimentadas con dietas a base de ensilado de pescado.

La evaluación biológica del ensilado fue realizada con 160 codornices japónica (*Coturnix coturnix japónica*) de 21 días de edad y peso promedio de 78.06 ± 3.96 g., las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro jaulas de 78 cm de largo, 55 cm de ancho y 35 cm de altura. Cada una de las jaulas fue dividida en cuatro compartimentos para alojar en cada uno a 10 codornices con la finalidad de formar cuatro repeticiones por cada tratamiento. Una vez que los animales fueron alojados, se hizo una distribución completamente al azar de las dietas experimentales (Tabla 4) para llevar a cabo su aplicación. El experimento fue realizado durante 35 días manteniendo a las aves bajo condiciones higiénicas y provistos con alimento y agua *ad libitum*. Cada grupo de codornices (repetición) diariamente recibió 700 g de alimento, así como también fue registrado el peso de alimento sobrante, lo cual sirvió para calcular el

consumo diario de alimento. Los animales fueron pesados al inicio del experimento y después cada semana para calcular por diferencia la ganancia de peso. Con los datos de alimento consumido y ganancia de peso, fue calculada la conversión alimenticia con la fórmula siguiente:

$$\text{Conversión alimenticia} = \text{Alimento consumido (g)}/\text{peso ganado (g)}$$

7.3.3. Evaluación de rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne de codornices alimentadas con dietas a base de ensilado de pescado.

Una vez terminada la etapa de crecimiento, cinco codornices de cada uno de los tratamientos experimentales fueron seleccionadas al azar para ser sacrificadas y obtener la canal. El peso de las canales fue registrado para calcular el rendimiento en caliente de las mismas por medio de la fórmula siguiente:

$$\text{Rendimiento de canal (\%)} = (\text{Peso de la canal}/\text{peso vivo}) * 100$$

Inmediatamente después de haber registrado el peso de las canales, fueron envueltas perfectamente con bolsas de polietileno para ser congeladas. Después de un mes de congelación se realizó el análisis sensorial de la carne; para lo cual, las canales de codorniz fueron descongeladas en un horno de microondas y enseguida fueron cocidas. La cocción se hizo manteniendo las codornices en bolsas de plástico e introduciéndolas en agua caliente a 80°C durante 45 minutos (Fagbenro y Jauncey, 1995). Enseguida fue separada la carne de la pechuga y su evaluación sensorial fue realizada por un panel entrenado de 14 jueces usando una escala de 1 a 9, donde 1 fue la más baja y 9 la más alta intensidad para cada uno de los parámetros que se muestran en el formato (Anexo 4).

Los resultados obtenidos de cada una de las variables de producción, rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne, fueron analizados por ANDEVA correspondiente a un diseño estadístico completamente al azar y la comparación de medias se hizo con la prueba de Tukey-Kramer a un nivel de significancia ($P = 0.05$).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Establecimiento de las condiciones de fermentación.

8.1.1. Efecto del nivel de melaza sobre la fermentación.

El ensilaje biológico requiere la adición de carbohidratos altamente fermentables para facilitar la acción de las bacterias lácticas, debido a que en el pescado existen escasas cantidades de estos compuestos (Jay, 2000; Hall, 2002). Entre otras fuentes de carbono, la melaza de caña de azúcar ha sido la más utilizada para este propósito en concentraciones desde 5 hasta 40% (Fagbenro y Jauncey, 1995., 1998; Zahar y *col.*, 2002).

Con el propósito de seleccionar la mejor concentración de la fuente de carbono, se evaluaron tres niveles de melaza 6, 12 y 18% (p/p) sobre la fermentación de la mezcla de desechos de pescado de diversas especies. Como iniciador fue utilizado *Lactobacillus plantarum* y las muestras sin inóculo fueron usadas como control. La fermentación fue realizada en microsilos tipo frasco durante 360 h.

8.1.1.1. Efecto sobre el pH y producción de ácido láctico.

Mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer se mostró que la fermentación fue mejor ($P < 0.05$) utilizando 18% de melaza (p/p) y con adición de cultivo iniciador (Anexo 5). Bajo esas condiciones, se obtuvo la más alta acidificación cuando el pH disminuyó de 6.34 a 4.44 a las 48 h y la mayor producción de ácido láctico fue presentada a las 96 h de fermentación con un valor de 0.5 mmol/g (Figuras 4 y 5).

Después de 192 h de fermentación, inició la fase de muerte de las bacterias lácticas, lo cual provocó una caída en la producción de ácido láctico y ligero aumento del pH. Esto último se debió probablemente al efecto amortiguador de aminoácidos y otras sales en el ensilado, así como también a la neutralización parcial del ácido por el calcio presente (Hall, 2002). Al final del proceso de fermentación, los ensilados con 18% de melaza e inoculados presentaron valores de ácido láctico y pH de 0.38 mmol/g y 4.55, respectivamente.

Los factores que contribuyeron significativamente a la rapidez de la acidificación fueron la adición de inóculo y la gran disponibilidad de azúcares fermentables presentes en la melaza (Owens y Mendoza, 1985, Bozoglu y Ray, 1996). Por tal motivo, es de gran importancia seleccionar el nivel y la fuente de carbono, así como también el cultivo iniciador para lograr que la fermentación sea exitosa (Shirai y *col.*, 2001; Cira y *col.*, 2002; Vidotti y *col.*, 2002).

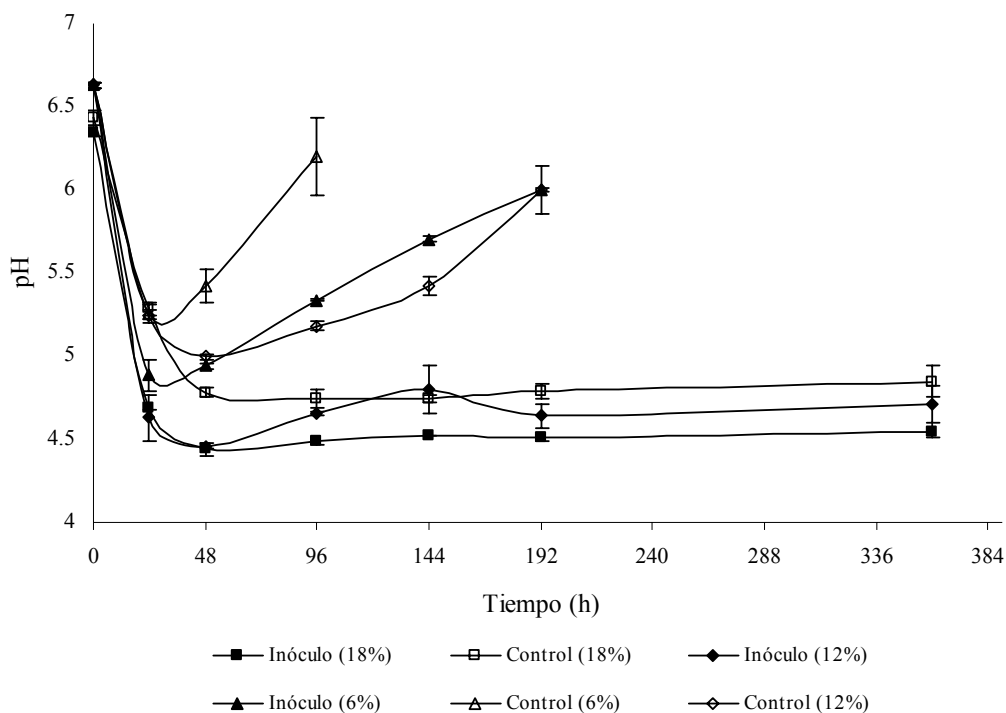


Figura 4. Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado realizada en microsilos tipo frasco, adicionada con 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* y diferentes niveles de melaza (p/p).

Los microorganismos acidificantes pueden estar presentes en la microflora nativa como ha sido reportado por Guerouali y *col.* (1995) y Zahar y *col.* (2002) quienes evitaron la adición de inóculo y emplearon altos niveles de melaza 50 y 40% (p/p), respectivamente, para fermentar desechos de sardina. Sin embargo, estos autores obtuvieron valores de pH de 4.5 a las 168 h, mientras que en la presente investigación se alcanzó el mismo pH a las 48 h. De tal forma, el uso de inóculo es recomendable para iniciar una producción rápida de ácido láctico, además permite un mejor control de la fermentación (Neave, 1986; Hall, 2002).

Los ensilados con 6% de melaza presentaron los valores más altos de pH (5.42 y 4.94) y los más bajos de ácido láctico (0.11 y 0.20 mmol/g) a las 48 h de fermentación para el control y muestras inoculadas, respectivamente (Figuras 4 y 5). Estos ensilados presentaron signos de putrefacción, por lo que fueron descartados.

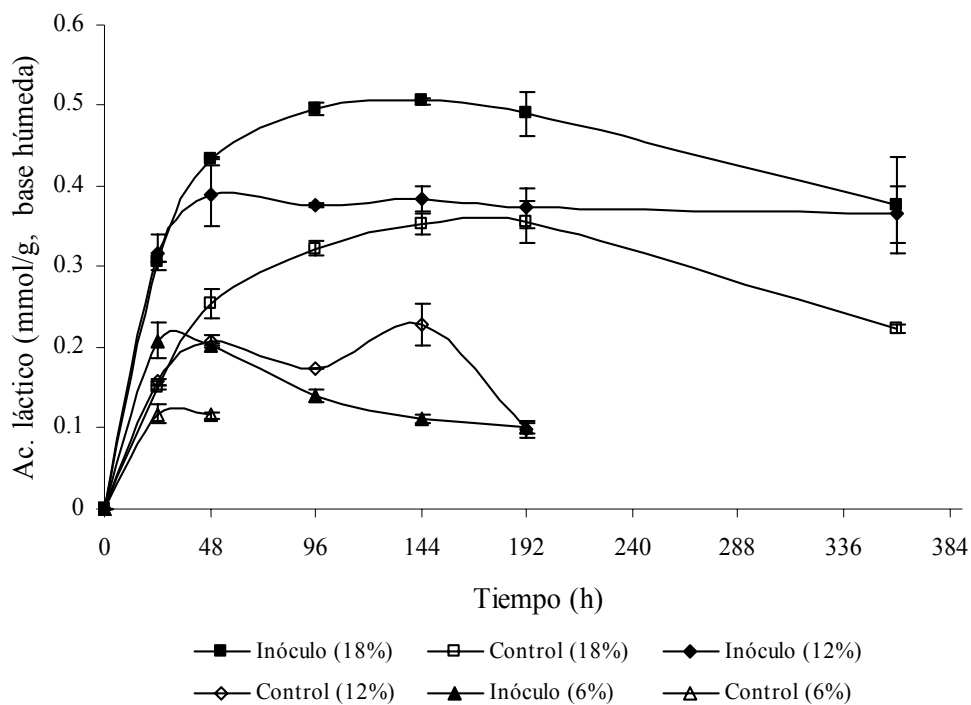


Figura 5. Producción de ácido láctico durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos tipo frasco adicionada con 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* y diferentes niveles de melaza (p/p).

8.1.1.2. Efecto en la actividad de agua (A_w).

La adición de azúcares solubles disponibles también mostró efecto sobre la A_w , tal como fue presentado en las fermentaciones de desechos de pescado con niveles de melaza de 12 y 18%. Estos ensilados mostraron disminución de la A_w durante el transcurso de la fermentación, siendo significativos la adición de inóculo y el nivel de melaza ($P < 0.05$), (Anexo 5). Al usar 18% de melaza e inóculo se obtuvo el mayor descenso de la A_w de un valor inicial de 0.976 a 0.956, al tiempo en que finalizó la fermentación (360 h) (Figura 6).

Esto se puede explicar debido a que durante la fermentación ocurre la autólisis de las proteínas por acción de enzimas endógenas, lo cual incrementa la concentración de amonio, aminas, aminoácidos y péptidos (Enes Dapkevicius y col., 1998). Estos compuestos, en conjunto con los azúcares presentes sufren una hidratación haciendo menos disponible el agua del ensilado e inhibiendo el desarrollo de microorganismos dañinos (Horner, 1997; Madigan y col., 2001).

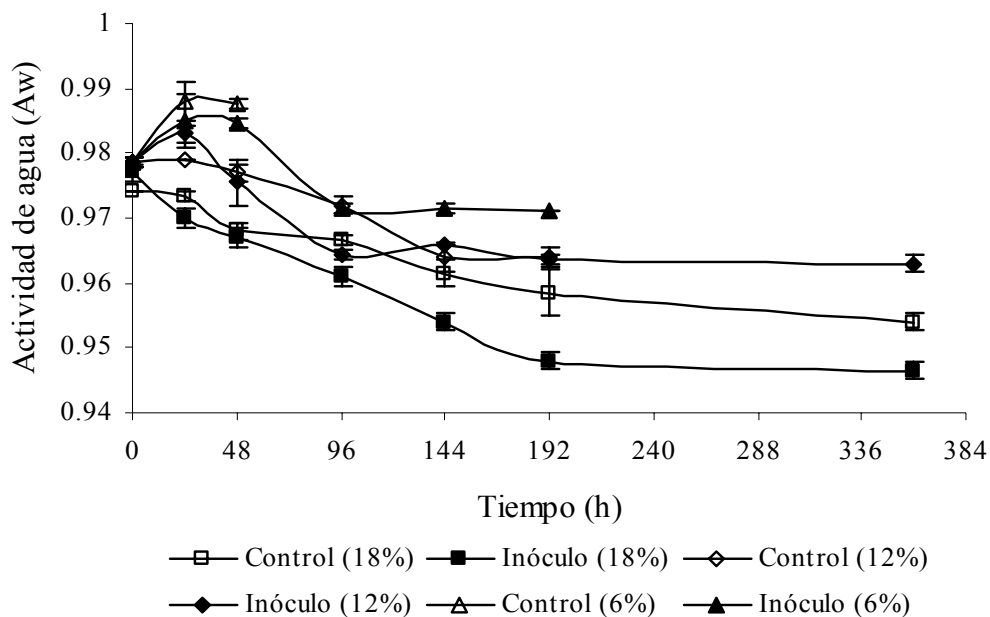


Figura 6. Cambios en actividad de agua durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado realizada en microsilos tipo frasco, adicionada con 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* y diferentes niveles de melaza (p/p).

8.1.1.3. Efecto en el consumo de azúcares.

Fue observado un mayor consumo de azúcares durante las primeras 96 h de fermentación usando cultivo iniciador, lo cual estuvo relacionado con los valores de pH y ATT obtenidos. Después de este tiempo, existió mayor disponibilidad de azúcares en las fermentaciones con 18% de melaza, en comparación con los ensilados de 6 y 12% de inclusión (Figura 7).

Los carbohidratos no fueron consumidos completamente durante la fermentación, observándose al final del proceso un gasto total de 85.79 y 93.23% en los ensilados inoculados y adicionados con 18 y 12% de melaza, respectivamente.

No es recomendable el consumo total de los carbohidratos durante la fermentación, ya que el equilibrio entre la producción de ácido láctico y amonio en el pescado depende de la cantidad de azúcares libres y la presencia de bacterias lácticas viables; lo cual es determinante para mantener estable el producto (Han-Ching y col., 1992). Por lo tanto, las fermentaciones posteriores fueron desarrolladas utilizando 18% de melaza y con adición de inóculo.

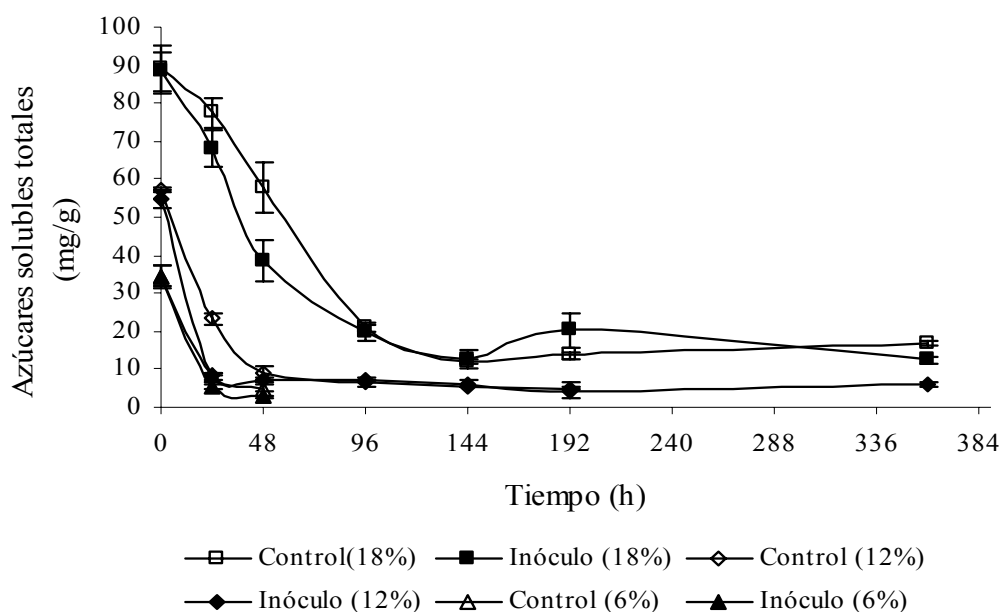


Figura 7. Consumo de azúcares solubles totales durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos tipo frasco adicionada con 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* y diferentes niveles de melaza (p/p).

8.1.2. Efecto de la fuente de desecho de pescado y tipo de reactor sobre la fermentación.

El proceso de producción de ensilados es multifactorial; por lo tanto, incluye muchos pasos que deben ser considerados y controlados cuidadosamente para lograr que la fermentación sea exitosa al obtenerse valores de pH por debajo de 4.5 en tiempo corto; además, deberá mantenerse estable el producto por un tiempo considerable (Weinberg y Ashbell, 2003).

El tipo y la calidad de desecho pesquero utilizado para la fermentación son determinantes en la calidad del ensilado de pescado, ya que existe la posibilidad de una variación considerable entre lotes debido al origen del pescado utilizado (Arason, 1994).

Además de otros factores, el tipo de reactor utilizado para la fermentación puede afectar la cinética de acidificación así como también las características del producto (Lonsane y col., 1992). En ese sentido, se ha reportado el uso de un fermentador dinámico para elaborar ensilados de desechos de crustáceos; por medio del cual, la agitación facilita la separación del ensilado en fracciones sólida y líquida (Zakaria y col., 1998). Sin embargo, este tipo de reactor tiene la desventaja de incrementar los costos de producción. Por lo contrario, se han realizado exitosamente fermentaciones de desechos de camarón utilizando un reactor estático de columna y de dos módulos, el cual también permite separar el ensilado en dos fracciones (sólida y líquida), obteniéndose productos con valor agregado como quitina e hidrolizados proteínicos (Cira y col., 2002).

Después de haber definido el nivel de melaza para llevar a cabo la fermentación, en este experimento se evaluó el efecto de tres fuentes de desecho de pescado: i) FAC ii) desechos de barracuda mexicana (SB), iii) mezcla de desechos de varias especies de pescado (MD). Además, se evaluó el uso de dos tipos de reactores (microsilos) estáticos: i) frasco, ii) de lecho empacado, cuyas características fueron descritas previamente (sección 7.1.1.4).

Como fuente de carbono fue utilizado 18% de melaza (p/p, base húmeda) y como iniciador fue utilizado 5% de *Lactobacillus plantarum* (v/p, base húmeda). La fermentación se llevó a cabo a 30°C durante 192 h y fueron realizados muestreos cada 24 h para medir los cambios de pH, producción de ácido láctico y Aw.

Los factores estudiados (adición de inóculo, tipo de desecho, y tipo de reactor) fueron significativos en la mayoría de sus interacciones sobre la acidificación ($P < 0.05$) (Anexo 6). De acuerdo a la prueba de Tukey-Kramer se observó que la acidificación fue mejor usando cultivo iniciador. El pH más bajo lo presentaron los ensilados de desechos de barracuda (4.18) y el pH más alto los ensilados de mezcla de desechos con 4.49, ambos en microsilos tipo frasco a las 96 h (Tabla 5).

A pesar de mostrar diferencia significativa por efecto de tipo de desecho y reactor, todas las fermentaciones inoculadas mostraron valores de pH y acidez satisfactorios, ya que es

recomendable obtener valores de pH por debajo de 4.5 para mantener estables los ensilados de pescado (Enes Dapkevicius y col., 2000).

Lo anterior fue evidenciado, ya que los ensilados en la mayoría de los tratamientos presentaron valores de pH que les permitió mantenerse estables hasta el final del proceso de fermentación (Figuras 8 y 9).

Tabla 5. Valores de pH, acidez total titulable, producción máxima de ácido láctico (P_{max}) y A_w a 96 h en fermentaciones de desechos de pescado adicionadas con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* usando dos tipos de microsilos.

Condiciones de fermentación		pH	ATT (mmol/g)	P_{max} (mmol/g)	Coefficiente de Determinación (R^2)	A_w
Mezcla (MD)	Frasco	4.49 a	0.50 a	0.491	0.988	0.960 b
	Lecho empacado	4.33 c	0.47 a	0.597	0.957	0.966 a
Barracuda (SB)	Frasco	4.18 d	0.41 b	0.414	0.943	0.949 c
	Lecho empacado	4.34 c	0.44 b	0.436	0.953	0.950 c
FAC	Frasco	4.43 b	0.37 c	0.361	0.984	0.960 b
	Lecho empacado	4.40 b	0.44 b	0.443	0.967	0.961 b

a, b, c y d: Valores en cada columna con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Los ensilados con mezcla de desechos de pescado presentaron la acidez más alta; sin embargo, sus valores de pH no fueron los más bajos comparados con los productos de otras fuentes de desechos pesqueros (Tabla 5). Esto se puede explicar debido a un posible efecto amortiguador de los minerales sobre el ácido producido (White y col., 1999), ya que la mezcla de desechos crudos (sin fermentar) presentó mayor contenido de cenizas (18.94% en base seca), mientras que la FAC y desechos de barracuda presentaron 18.11, y 16.63%, respectivamente.

Los valores de pH observados en este estudio para los ensilados inoculados fueron satisfactorios para la conservación de diferentes desechos de pescado sin necesidad de algún tratamiento previo, tal como acidificación, salado, cocción o congelado, lo cual disminuye los costos de producción.

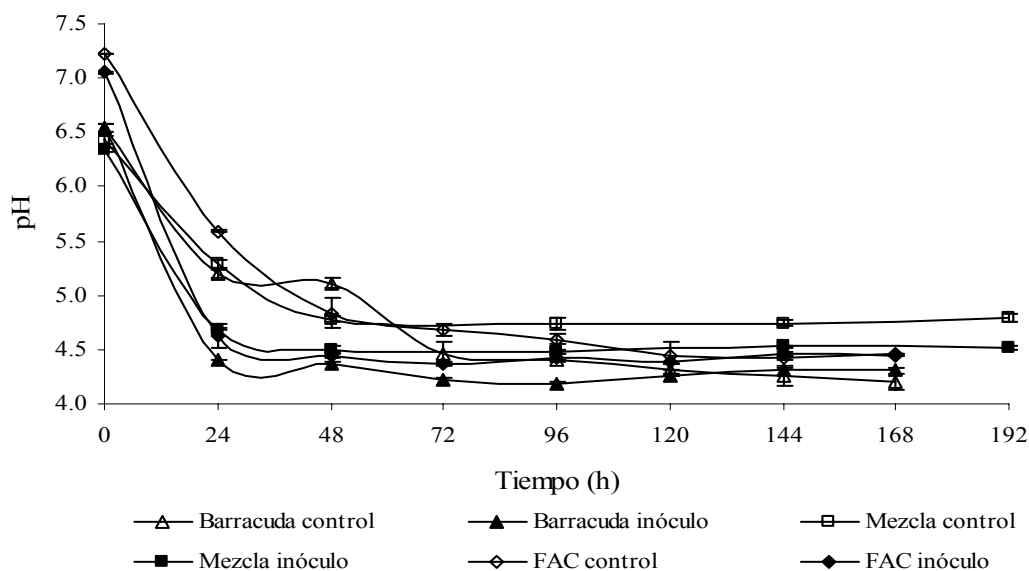


Figura 8. Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de diferentes fuentes de desechos de pescado en microsilos tipo frasco adicionada con 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* y 18% de melaza (p/p).

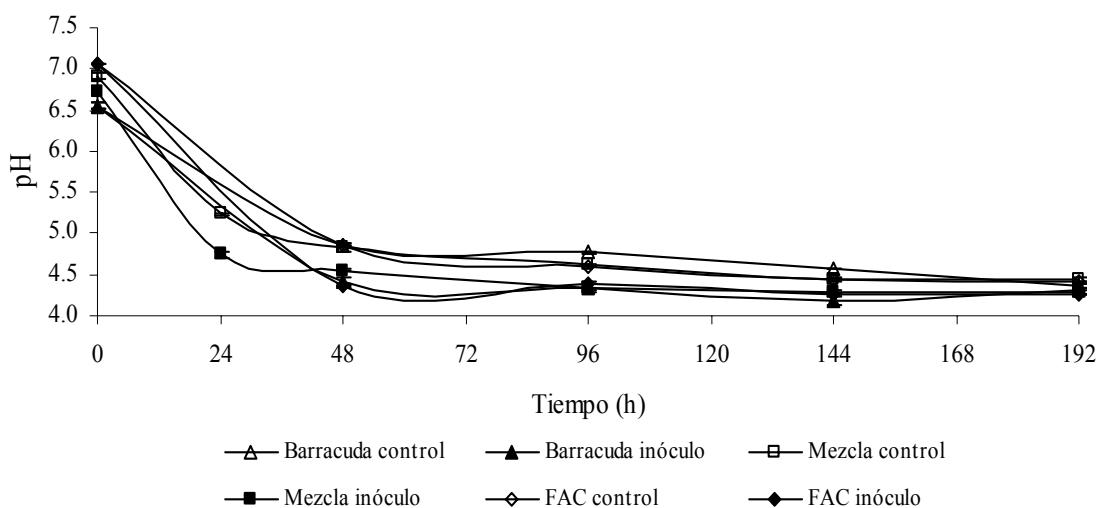


Figura 9. Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de diferentes fuentes de desechos de pescado en microsilos tipo lecho empacado, adicionada con 5% (v/p) de *Lactobacillus plantarum* y 18% de melaza (p/p).

Además, estos resultados de pH concuerdan con los reportados para ensilado biológico de tilapia con valor de 4.41 (Fagbenro y Jauncey, 1998), fermentaciones de diferentes fuentes de desechos pesqueros (4.06 a 4.48) (Vidotti y col., 2002) y fermentaciones de desechos de camarón (Cira y col., 2002).

Sin embargo, se ha reportado un pH de 4.78 para ensilados de subproductos (cabezas y vísceras) de perca blanca (Hassan y Heath, 1987), lo cual difiere con los valores obtenidos en el presente estudio. Además, los resultados del presente trabajo son mucho mejores a los obtenidos para fermentaciones de desechos de gamba (*Nephrops norvegicus*) con valores de pH 5 y 1% de ácido láctico a las 48 h de fermentación (Zakaria y col., 1998).

La producción máxima de ácido láctico para las fermentaciones empleando las tres fuentes de desecho de pescado y los dos tipos de reactor (microsilos) fue estimada por el modelo no lineal de Gompertz. Los datos de acidificación y tiempo presentaron alta correlación ($R^2 > 0.90$) con este modelo. En la tabla 5 se muestra que el uso del reactor de lecho empacado fue mejor en términos de acidificación. Por ejemplo, la más alta producción de ácido fue determinada en los ensilados de mezcla de desechos de pescado elaborados en los reactores de lecho empacado.

La concentración de azúcares y ácidos en la pasta sólida favoreció la producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum*, el cual es un microorganismo homofermentativo y tolerante a esas condiciones, llegando a predominar sobre la microflora nativa (Horn y col., 2005).

Por otra parte, el uso de *Lactobacillus plantarum* como cultivo iniciador puede mantener la acidez suficiente en el producto y prevenir algunas alteraciones por microorganismos indeseables y/o contaminación por bacterias toxigénicas tales como *Clostridium* o *Salmonella*. Además, no sólo el ácido producido por *Lactobacillus plantarum* podría tener un papel importante en la preservación, sino también algunos metabolitos antimicrobianos pueden ser producidos por esta especie, los cuales pueden contribuir a la preservación del ensilado contra patógenos (Faid y col., 1994; Ouwehand, 1998; Holo y col., 2001).

Por otra parte, la A_w disminuyó de un valor inicial de 0.978 a valores entre 0.943 y 0.966 a las 96 h de fermentación para los diferentes tratamientos (Tabla 5). Esto puede ser debido a la degradación de las proteínas por enzimas endógenas del pescado, lo cual da origen a péptidos pequeños que, en conjunto con los azúcares residuales provocan que la A_w disminuya (Viana, 1996; Horner, 1997).

Cuando la A_w es mantenida por debajo de 0.97, como ocurrió en ambos sistemas de fermentación, los microorganismos nocivos como *Pseudomonas* y *Vibrio*, así como también las bacterias ácido lácticas heterofermentativas tales como *Leuconostoc sp.* son inhibidas, por lo cual se logró mantener estable el producto (Lücke, 1995; Madigan y col., 2001).

El tipo de desecho y reactor mostraron efecto significativo, así como también la mayoría de las interacciones entre los tres factores sobre la A_w ($P < 0.05$). De acuerdo a la prueba de Tukey-Kramer, los ensilados con menor A_w fueron los elaborados con los desechos de barracuda empleando ambos tipos de reactores y con adición de inóculo, aunque no existió diferencia significativa entre ambos tratamientos ($P > 0.05$) (Tabla 5, Anexo 6).

Sin embargo, con el reactor de lecho empacado se tiene la ventaja de poder separar los desechos fermentados en dos fracciones (pasta y licor), lo cual permite mayor deshidratación de la pasta obtenida y una remoción continua de calcio y productos de la hidrólisis de las proteínas (péptidos, aminoácidos y amonio) en el licor. Esto último hace que el efecto amortiguador de esas sustancias disminuya; de modo que, el tiempo de conservación se ve incrementado. Además, el licor producido representa una fuente de hidrolizados proteínicos que le dan un valor agregado a los desechos pesqueros (Cira y col., 2002).

Debido a que la FAC y los desechos de barracuda son obtenidos temporalmente, en comparación con la mezcla de desechos de pescado, los cuales son disponibles y abundantes durante todo el año, las fermentaciones posteriores se hicieron empleando estos últimos subproductos. Sin embargo, con los resultados obtenidos se pudo demostrar que es posible producir fermentaciones exitosas empleando cualquiera de las tres fuentes de desechos pesqueros.

8.1.3. Selección del cultivo iniciador.

Para lograr un mejor control de los procesos fermentativos se requiere seleccionar cepas de bacterias lácticas que sean capaces y rápidas para producir suficiente ácido; además de otros metabolitos que permitan mantener estable el producto por tiempos largos (Van Wyk y Heydenrych, 1985; Han-Ching y *col.*, 1997; Hall, 2002). En ese sentido, las bacterias lácticas difieren en su habilidad para estabilizar el ensilado, más cuando la materia prima utilizada es de mala calidad (Van Wyk y Heydenrych, 1985).

El uso de un cultivo iniciador selecto asegura la acidificación rápida y el dominio de microorganismos capaces de conducir el proceso de ensilaje (Shirai y *col.*, 2001). Además, la fermentación rápida es recomendable por razones económicas, ya que disminuye el riesgo de descomposición y se evita la hidrólisis proteínica excesiva de los ensilados, lo cual deprecia su valor nutritivo principalmente para animales rumiantes (Haard y *col.*, 1985).

8.1.3.1. Efecto del tipo de inóculo sobre la evolución del pH.

Los resultados obtenidos reafirmaron que las fermentaciones con iniciador fueron más exitosas comparadas con los ensilados sin inóculo. El contenido de ácido láctico y por lo tanto el pH entre los ensilados, fueron significativamente diferentes después de las 48 h de fermentación ($P < 0.05$) (Anexo 7). La fermentación con *Lactobacillus* sp. B2 fue mejor que con *Lactobacillus plantarum* y el control, alcanzando valores de pH de 4.3, 4.5 y 4.7, respectivamente. Estos valores se mantuvieron estables hasta las 192 h de fermentación (Figura 10). Sin embargo, después de ese tiempo el pH incrementó para alcanzar valores de 5.05, 5.33 y 5.64 a las 720 h en los ensilados con *Lactobacillus* sp. B2, *Lactobacillus plantarum*, y el control, respectivamente (Figura 10).

Este incremento de pH se debió muy probablemente a la disminución en la producción de ácido, así como también al efecto amortiguador de las proteínas y péptidos derivados de su hidrólisis (Faid y *col.*, 1994).

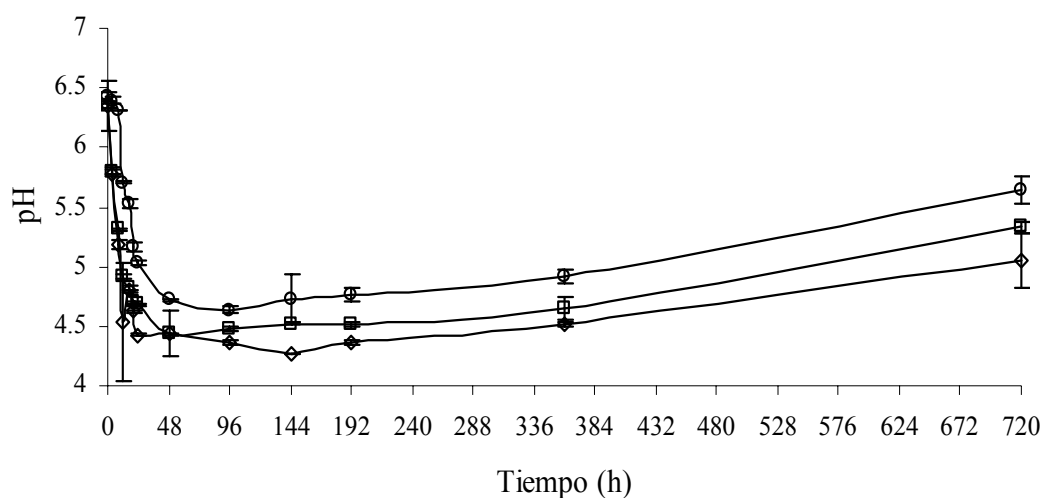


Figura 10. Evolución del pH durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos tipo frasco, adicionada con 18% de melaza (p/p); o Control (sin inóculo) y 5% (v/v) de iniciador: \square *Lactobacillus plantarum*, \diamond *Lactobacillus sp. B2*.

8.1.3.2. Efecto del tipo de inóculo sobre la producción de ácido láctico y consumo de azúcares.

El nivel máximo de ácido láctico fue presentado a las 96 h de fermentación, existiendo diferencia significativa entre tratamientos ($P < 0.05$) (Anexo 7). A ese tiempo, los ensilados inoculados con *Lactobacillus sp. B2* presentaron mayor contenido de ácido láctico (0.56 mmol/g), que los ensilados con *Lactobacillus plantarum* y el control, los cuales mostraron una concentración de ácido láctico de 0.49 y 0.38 mmol/g, respectivamente (Figura 11). Esas diferencias se vieron relacionadas con el consumo de carbohidratos.

En la Figura 12 se observa que la diferencia en el consumo de carbohidratos entre el control y los ensilados inoculados fue presentada principalmente a las 48 h de fermentación, cuando disminuyó la concentración de azúcar inicial de 0.492 mmol/g hasta 0.317, 0.214 y 0.167 mmol/g para el control, ensilados con *Lactobacillus plantarum* y con *Lactobacillus sp. B2*, respectivamente. Al final de la fermentación, los azúcares no fueron consumidos totalmente, mostrando el producto inoculado con *Lactobacillus sp. B2* un contenido de 0.045 mmol/g.

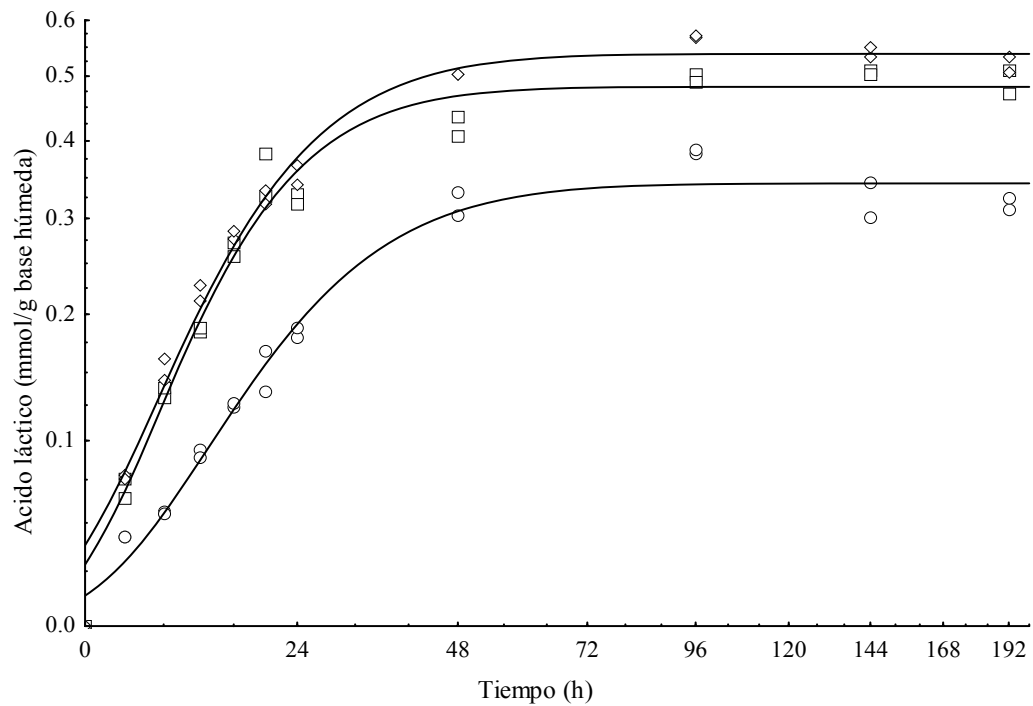


Figura 11. Producción de ácido láctico durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos tipo frasco, adicionada con 18% de melaza (p/p); o Control (sin inóculo) y 5% (v/p) de iniciador: □ *Lactobacillus plantarum*, ◇ *Lactobacillus sp. B2*.

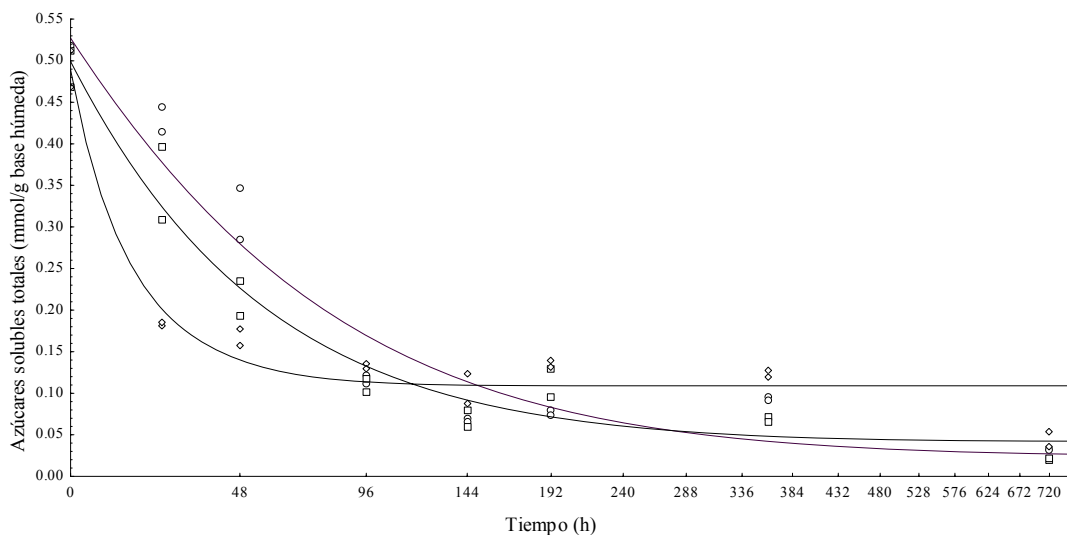


Figura 12. Consumo de azúcares solubles totales durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos tipo frasco, adicionada con 18% de melaza (p/p); o Control (sin inóculo) y 5% (v/p) de iniciador: □ *Lactobacillus plantarum*, ◇ *Lactobacillus sp. B2*.

8.1.3.3. Ajuste de los datos con el modelo de Gompertz.

Los datos de producción de ácido láctico y consumo de azúcares empleando ambos iniciadores y el tratamiento control (sin inóculo) fueron ajustados al modelo no lineal de Gompertz, mostrando coeficientes de correlación (R) superiores a 0.9 (Figuras 11 y 12, Tabla 6).

Los valores de P_{\max} incrementaron con la adición de inóculo, así como también los valores de V_{\max} y k tanto para la producción de ácido como para el consumo de azúcares (Tabla 6).

La V_{\max} de producción de ácido láctico fue igual para los ensilados empleando ambos iniciadores y mucho mayor que el control. Además, los valores de k para ácido láctico fueron similares para los ensilados con *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus* sp. B2.

Tabla 6. Constantes cinéticas estimadas por el modelo de Gompertz para producción de ácido láctico y consumo de azúcares en fermentaciones de desechos de pescado, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de iniciadores: *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus* sp. B2.

Condición de fermentación	Producción de ácido				Consumo de azúcares				Rendimiento (Y)
	P_{\max} (mmol/g)	k (h ⁻¹)	V_{\max} (mmol/gh)	(R)	S_{\max} (mmol/g)	k (h ⁻¹)	V_{\max} (mmol/gh)	(R)	
Control	0.34	0.072	0.009	0.98	0.43	0.036	0.005	0.99	0.791
<i>L. plantarum</i>	0.48	0.093	0.016	0.98	0.42	0.042	0.006	0.98	1.142
<i>L. sp. B2</i>	0.54	0.084	0.016	0.99	0.37	0.121	0.016	0.96	1.459

(R) = Coeficiente de correlación

Y = Rendimiento de ácido láctico = P_{\max}/S_{\max}

Por otra parte, el control así como también el ensilado inoculado con *Lactobacillus plantarum* presentaron valores de S_{\max} idénticos y más altos que el valor estimado para el producto con *Lactobacillus* sp. B2. Sin embargo, la máxima producción de ácido láctico (P_{\max}) fue mayor usando *Lactobacillus* sp. B2. Además, el rendimiento de ácido láctico (Y) fue más alto con *Lactobacillus* sp. B2 que con *Lactobacillus plantarum* y el control (Tabla 6).

Las diferencias mostradas se pueden deber a que *Lactobacillus* sp. B2 presenta un patrón homofermentativo; además, ha sido reportado como mejor acidificante entre otras bacterias lácticas (Shirai y col., 1999).

La producción de ácido en la fermentación láctica de desechos pesqueros depende de la naturaleza del sustrato, la fuente de carbono y el cultivo iniciador utilizado (Arason, 1994). En ese sentido, los parámetros de P_{\max} y V_{\max} para ácido láctico obtenidos en el presente estudio, fueron superiores a los reportados para fermentaciones de desechos de camarón empleando sacarosa como fuente de carbono y *Lactobacillus* sp. B2 como iniciador (Cira y col., 2002).

Debido a las ventajas presentadas por *Lactobacillus* sp. B2 como mejor acidificante, fue seleccionado para llevar a cabo las fermentaciones de los experimentos siguientes.

8.1.4. Fermentación en reactor (microsililo) de leche empacado.

8.1.4. 1. Evolución del pH y producción de ácido láctico.

Después de haber seleccionado el cultivo iniciador, fue diseñado este experimento con el propósito de evaluar la estabilidad de los ensilados de pescado a tiempos más prolongados.

Los microsilos fueron elaborados en reactor de lecho empacado utilizando la mezcla de desechos de pescado (MD), adicionada con 18% de melaza (p/p, base húmeda) y 5% de *Lactobacillus* sp. B2 (v/p, base húmeda).

La adición de inóculo aceleró la producción de ácido láctico durante los primeros 6 días de fermentación obteniéndose valores de 0.49 y 0.43 mmol/g (base húmeda) para ensilados inoculados y sin inóculo, respectivamente (Fig 13). Enseguida, la producción de ácido láctico presentó un declive en muestras inoculadas para permanecer casi constante con promedio de 0.47 mmol/g hasta los 120 días de fermentación.

Los valores más bajos de pH fueron registrados a los 4 días de fermentación, llegando a 4.38 y 4.56 en los ensilados inoculados y sin inóculo, respectivamente. Los ensilados inoculados alcanzaron ese valor de pH en tiempos inferiores de 11 y 3 días a lo reportado recientemente por Enes Dapkevicius y col. (1998) y Zahar y col. (2002), respectivamente.

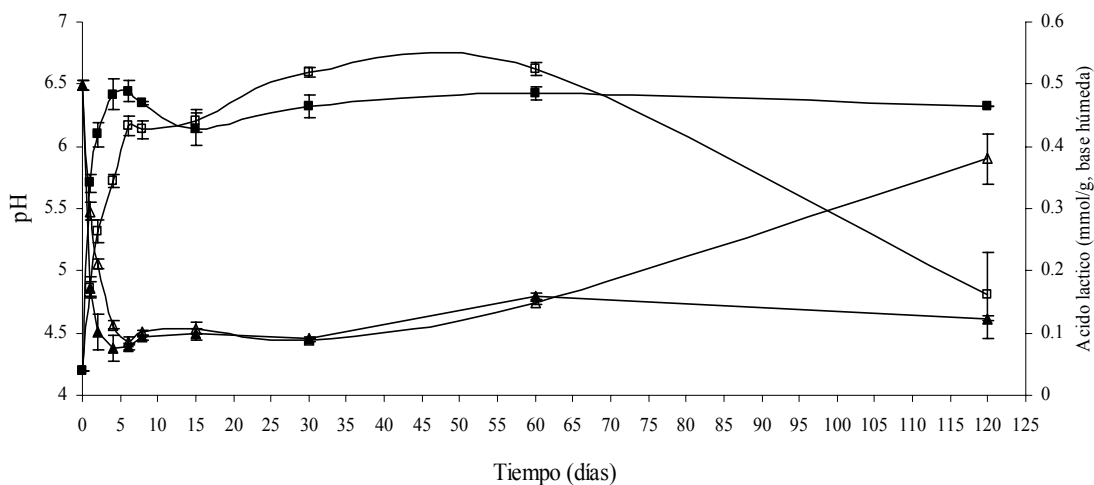


Figura 13. Evolución del pH y ATT durante la fermentación ácido láctica de mezcla de desechos de pescado en microsilos de lecho empacado, adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2. Símbolos: pH (Δ control, ▲ inóculo), ácido láctico (□ control, ■ inóculo).

Posteriormente, los ensilados sin inóculo presentaron un incremento brusco del pH a partir de los 60 días de fermentación, mostrando signos de descomposición y alcanzando un pH final de 5.9. Contrariamente, las fermentaciones que fueron inoculadas permanecieron estables hasta las 120 días de fermentación con un pH final de 4.6 (Figura 13).

Estas diferencias pueden ser atribuidas a la capacidad que presentan muchas bacterias lácticas de suprimir el crecimiento de microorganismos dañinos y patógenos por medio del ácido láctico, el pH y efecto de bacteriocinas (Kim, 1995; Ray, 1996; Vazquez y col., 2005). Además, la conservación del producto se puede deber al diseño del reactor de lecho empacado empleado, el cual permitió la separación del licor durante la fermentación disminuyendo el contenido acuoso y sales de carbonato de calcio que presentan alta capacidad amortiguadora (Cira y col., 2002).

8.1.4.2. Cuenta total de bacterias coliformes y BAL.

El crecimiento microbiano es afectado por el ambiente extrínseco e intrínseco. Los factores intrínsecos incluyen nutrientes, factores de crecimiento y antimicrobianos, actividad de agua, pH y potencial de oxidación-reducción. En un sistema alimenticio ambos están presentes y en combinación ejercen efectos sobre el crecimiento microbiano (Ray, 2001).

Estudios microbiológicos de diferentes especies de pescado han revelado a *Pseudomonas-Alteromonas* (32-60%) y *Moraxella-Acitenobacter* (18-37%) como los organismos de descomposición más comunes (Jay, 2000).

Las bacterias coliformes totales disminuyeron significativamente en tres ciclos logarítmicos en los ensilados con inóculo para llegar a 1.5×10^2 ufc/g a los 30 días de fermentación, siendo inferiores al control. Después de ese tiempo, los ensilados con inóculo presentaron valores de coliformes casi constantes hasta los 120 días que tardó la fermentación (Figura 14). Contrariamente, los ensilados control mostraron signos de descomposición, al final de la fermentación, por lo cual no fueron analizados.

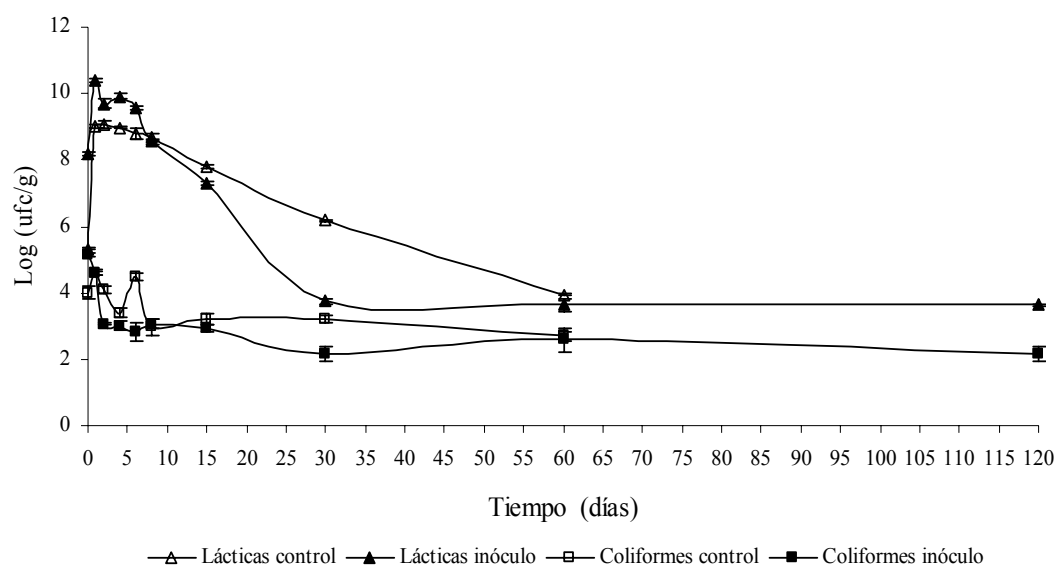


Figura 14. Cuentas de bacterias lácticas y coliformes totales durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos de lecho empacado, adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Ese comportamiento pudo deberse a la acción homofermentativa de *Lactobacillus* sp. B2, el cual produjo suficiente ácido láctico para inhibir el crecimiento de las coliformes, así como también a la disminución de A_w en el producto. Además, se puede atribuir a la actividad inhibitoria del ácido láctico a pH bajo, lo cual permite su difusión a través de la membrana en la forma no ionizada y posteriormente disociándose dentro de la célula, lo cual provoca que

algunos procesos metabólicos sean interrumpidos. En ese sentido, se sabe que a pH por debajo de 5 el ácido láctico puede tener un efecto bactericida especialmente contra bacterias Gram-negativas (Ray, 2001). Ese efecto también ha sido probado al disminuir las coliformes totales en dos ciclos logarítmicos en filetes de pescado, cuando se utilizó una combinación de ácido láctico y un cultivo de bacterias lácticas (Kim y col., 1995).

En el presente estudio, la disminución de las bacterias coliformes estuvo relacionada con el incremento de BAL, las cuales alcanzaron en promedio 9.88 ciclos logaritmos (8.3×10^9 ufc/g) en los ensilados con inóculo al llegar a la fase estacionaria durante los primeros 6 días de fermentación. Esa concentración de BAL fue superior a la que mostraron los ensilados sin inóculo (Figura 14). Las cuentas de BAL concuerdan con los valores reportados para fermentaciones de desechos de sardina adicionados con 30% de melaza e inoculados con *Lactobacillus plantarum* (Faid y col., 1994).

8.1.4.3. Cuenta total de bacterias mesofílicas y levaduras.

Las bacterias mesofílicas totales de ensilados inoculados incrementaron en aproximadamente 1.5 ciclos logarítmicos, alcanzando 5×10^9 ufc/g a los 4 días de fermentación. Sin embargo, después de ese tiempo las cuentas de mesofílicas disminuyeron para llegar a 3×10^4 ufc/g a los 30 días y permanecieron casi constantes hasta el final de la fermentación (Figura 15). Este comportamiento se puede explicar por la acción preservativa de las BAL debido la producción de metabolitos como ácido láctico, peróxido de hidrógeno hipotiocianato, tiocianato y bacteriocinas (Einarsson y Lauzon, 1995; Ouwehand, 1998; Carr y col., 2002).

Las levaduras pueden consumir los carbohidratos para transformarlos en dióxido de carbono y etanol, lo cual resulta en una pérdida de azúcares disponibles para producir ácido por las BAL (Van Wyk, y Heydenrych, 1985). Por tal motivo, es de gran importancia inhibir el crecimiento de levaduras durante el proceso fermentativo.

La adición de inóculo también afectó significativamente las cuentas de levaduras durante la fermentación al disminuir de 1.2×10^7 a 5.9×10^2 ufc/g, lo cual permitió incrementar la estabilidad del producto (Figura 15).

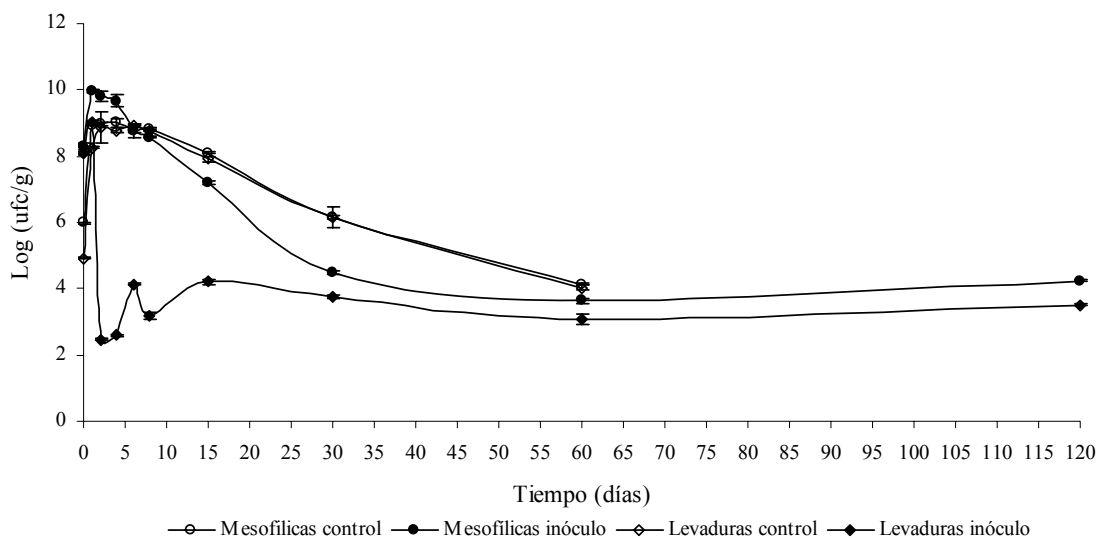


Figura 15. Cuentas de mesófilos y levaduras totales durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado en microsilos de lecho empacado, adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

La mayoría de los mohos son aerobios estrictos y atacan las capas superficiales de los ensilados; por lo tanto, debe evitarse su multiplicación ya que producen micotoxinas que pueden resultar extremadamente perjudiciales para los animales (Mc Donald y col., 1999). En el presente estudio; a pesar del tiempo de fermentación prolongado, no fueron encontrados mohos en los ensilados producidos.

8.1.4.4. Composición química proximal.

El ensilado de pescado obtenido en los microsilos presentó un contenido de proteína y lípidos de 39.89 y 14.49 g/100 g de materia seca, los cuales representan el 76.08 y 59.14% de la proteína bruta y lípidos del desecho crudo, respectivamente. Las cenizas fueron casi iguales en el ensilado y el material crudo. Sin embargo, el contenido de carbohidratos fue mucho más alto en el ensilado debido a la adición de melaza (Tabla 7).

El producto presentó color café grisáceo y aroma dulce agradable con débil olor a pescado, lo cual fue debido principalmente al efecto enmascarante de la melaza residual. Además, la actividad del inóculo pudo contribuir a la producción de compuestos aromáticos vía actividad

proteolítica que mejoran las propiedades organolépticas del producto (Bulut y col., 2005). Estas características pueden hacer atractivo y palatable el ensilado de pescado producido para ser aplicado en la formulación de dietas para animales.

Tabla 7. Composición química proximal^a de desecho de pescado crudo y ensilado a 144 h de fermentación en microsilos, adicionado con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Componentes	Mezcla de desecho de pescado	Ensilado
Humedad (%)	70.28	65.52
Proteína cruda (%) ^b	52.43	39.9
Lípidos totales (%)	24.50	14.49
Fibra cruda (%)	0.51	0.62
Cenizas (%)	19	18
Extracto libre de nitrógeno (%) ^c	3.62	26.93
pH	6.49	4.4
Acidez total titulable (mmol/g)	ND	0.49

a = Promedio de tres determinaciones, expresado como porcentajes en base seca.

b = Nitrógeno total * 6.25

c = 100 - (% de proteína cruda + % de lípidos totales + % de fibra cruda + % de cenizas).

ND: No determinado.

8.1.4.5. Distribución de pesos moleculares de la fracción proteínica.

Para evaluar el efecto de la acidificación sobre la hidrólisis proteínica durante el proceso fermentativo y conocer la distribución de los pesos moleculares de los péptidos resultantes, fueron analizados los licores recuperados de las fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas en reactores de lecho empacado (sección 7.1.2.4).

En el extracto proteínico del desecho de pescado crudo fueron observadas bandas de proteína con rango de PM desde 7 hasta 154 kDa (Figura 16). Esas bandas representan proteínas solubles en agua, sarcoplásmicas y también productos de la degradación de proteínas miofibrilares debido a la autólisis durante el manejo o proceso de obtención de los desechos

(Benjakul y Morrisey 1997). La mayoría de esas bandas estuvieron presentes en los ensilados sin inóculo a las 24 h de fermentación.

Una proteína de 44 kDa que puede corresponder a la actina, estuvo presente en el desecho de pescado crudo, así como en las muestras fermentadas sin inóculo a las 24 h. Sin embargo, la adición de inóculo facilitó la degradación de esa proteína, además no estuvo presente en los demás tratamientos y tiempos de fermentación.

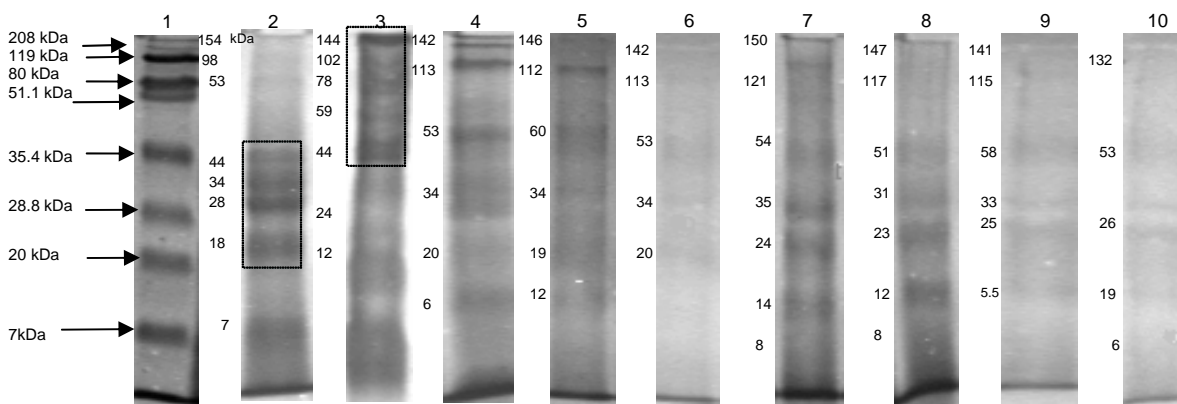


Figura 16.- Patrones de proteínas (PAGE-SDS) de ensilados de desechos de pescado. Carriles: 1 proteínas estándares (Bio Rad, Richmond), 2 desecho fresco (0 h). Ensilados: 3 control (24 h), 4 inoculado (24 h), 5 control (48 h), 6 inoculado (48 h), 7 control (144 h), 8 inoculado (144 h), 9 control (192 h), 10 inoculado (192 h).

Otra proteína de 78 kDa que se encontró en las muestras sin inóculo a las 24 h, fue degradada y no apareció en los demás ensilados. Además, fragmentos proteínicos de 12 kDa que estuvieron presentes en las muestras sin inóculo a las 24 y 48 h no fueron encontradas en muestras inoculadas a esos mismos tiempos (Figura 16). Sin embargo, después de las 24 h de fermentación, los patrones de proteínas fueron bastante similares para los ensilados inoculados.

Se han obtenido hidrolizados proteínicos de desechos de merluza producidos con neutrasa con rangos de PM entre 17 y 30 kDa, los cuales entran en el rango de PM obtenidos en este estudio (Benjakul y Morrisey 1997). Además, en otro estudio se obtuvieron hidrolizados proteínicos (6.5 kDa) de arenque empleando alcalasa que también entra en el rango de PM de las proteínas identificadas en el presente trabajo (Liceaga-Gesualdo y Li-Chan, 1999).

De los resultados de PAGE-SDS, se puede inferir que con la adición de inóculo se presenta una mayor actividad proteolítica en los ensilados de pescado, lo cual puede verse reflejado en un aumento de la digestibilidad de sus proteínas para ser aprovechadas más eficientemente en alimentación animal (Vidotti y col., 2002).

8.1.4.6. Grado de hidrólisis de las proteínas.

En la Figura 17 se muestra que al aumentar el tiempo de fermentación incrementó la hidrólisis proteínica. También se observa que la adición de cultivo iniciador incrementó los grupos α -aminos libres alcanzándose el máximo grado de hidrólisis (97.38%) a los 15 días de fermentación y siendo significativamente mayor ($P<0.05$) que en los ensilados sin inóculo (86.87%) (Figura 17, Anexo 8). Este comportamiento es debido a la producción de ácido láctico y disminución del pH por las bacterias lácticas, lo cual dió lugar a la activación de las proteasas digestivas endógenas de los desechos de pescado (Shirai y col., 1999).

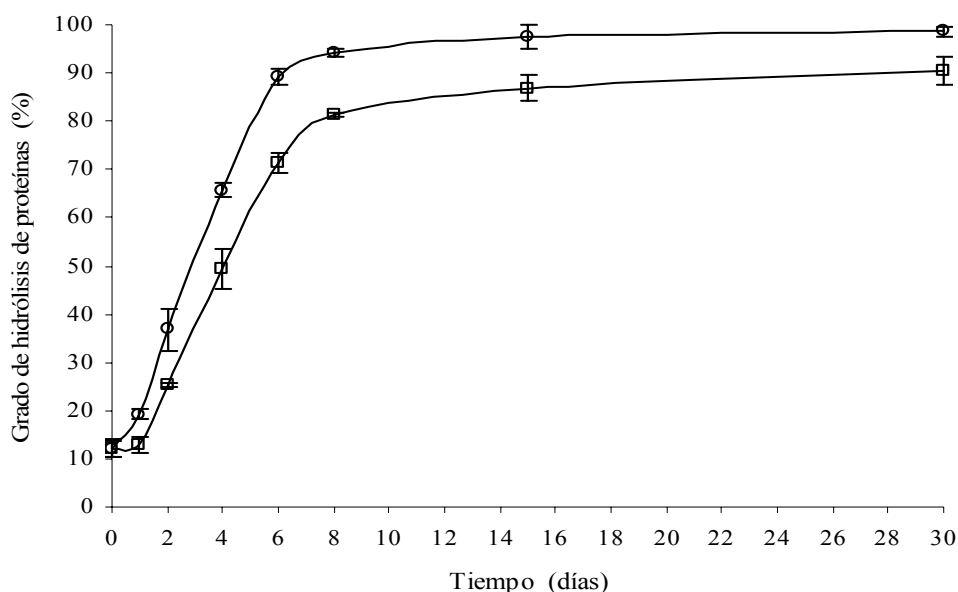


Figura 17.- Grado de hidrólisis de proteínas en fermentaciones de mezcla de desechos de pescado adicionadas con 18% de melaza (p/p) base húmeda. Símbolos: □ Control y ○ inoculada con 5% (v/p) base húmeda de *Lactobacillus* sp. B2.

Recientemente se ha reportado un grado de hidrólisis de aproximadamente 70% para salsas de pescado empleando una mezcla de subproductos de merluza (Tungkawachara y col., 2003). En ese sentido, los resultados obtenidos en este trabajo fueron superiores, lo cual se atribuye a la

proteólisis realizada en conjunto por las proteasas endógenas y las proteasas secretadas por las bacterias lácticas durante la fermentación (Yin y *col.*, 2005).

La hidrólisis proteínica hace el producto más digestible y podría ser conveniente en la formulación de dietas para animales en la etapa de iniciación del crecimiento. Además, los péptidos y aminoácidos libres podrían ser quimiatractantes potenciales, así como también estimulantes alimenticios para especies carnívoras (Lian y *col.*, 2005).

El uso de enzimas comerciales ha permitido producir hidrolizados de desechos pesqueros con porcentajes de hidrólisis como los obtenidos en el presente estudio, pero en tiempos más cortos (Benjakul y Morrisey, 1997; Liceaga-Gesualdo y Li-Chan, 1999; Pastoriza y *col.*, 2003). Sin embargo, el alto costo de las enzimas comerciales encarecen el proceso de producción y por lo tanto el precio de los hidrolizados obtenidos por ese método. De tal manera, mediante fermentación ácido láctica se podría evitar el uso de enzimas comerciales, haciendo el proceso de digestión económico para producir hidrolizados proteínicos (Lin y *col.*, 2005).

8.1.4.7. Digestibilidad *in vitro* de las proteínas.

Ensayos de alimentación en varias especies animales han mostrado la ventaja de tener parte de la proteína predigerida en la dieta, pero hay un límite sobre el cual los animales tendrían dificultad en usar la proteína absorbida para propósitos de síntesis. En ese sentido, alto grado de hidrólisis de la proteína de ensilado de pescado probablemente puede disminuir el valor nutritivo del alimento para rumiantes, pero no así para el caso de los animales monogástricos (Espe y *col.*, 1992).

Durante la producción de ensilado biológico de pescado, las bacterias lácticas juegan un papel muy importante en la acidificación y consecuente activación de proteasas endógenas presentes principalmente en el estómago e intestino, las cuales participan en la licuefacción. Por consecuencia, incrementa la hidrólisis y digestibilidad proteínica del ensilado, aumentando la formación de péptidos y aminoácidos libres altamente solubles, los cuales presentan propiedades nutricionales valiosas (Benjakul y Morrisey, 1997; Ravallec y *col.*, 2001). Esto

último ha sido controversial en cuanto a los beneficios que pueden ofrecer los hidrolizados proteínicos al ser utilizados en alimentos para animales (Espe y col., 1999). Sin embargo, es recomendable evaluar la digestibilidad proteínica del ensilado, ya que el valor nutricional de dietas balanceadas depende de la digestibilidad de cada ingrediente (Vidotti y col., 2002).

Las pruebas de digestibilidad de proteínas *in vitro* permiten estimar los resultados que se esperan obtener de los ensayos *in vivo*, además, los estudios *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápidos y económicos (Capetillo y col., 2001).

En el presente estudio, la adición de inóculo y el tiempo causaron efecto significativo ($P < 0.05$) sobre la digestibilidad proteínica de los ensilados, obteniéndose el valor más alto (88%) durante los dos primeros días de fermentación (Figura 18, Anexo 8).

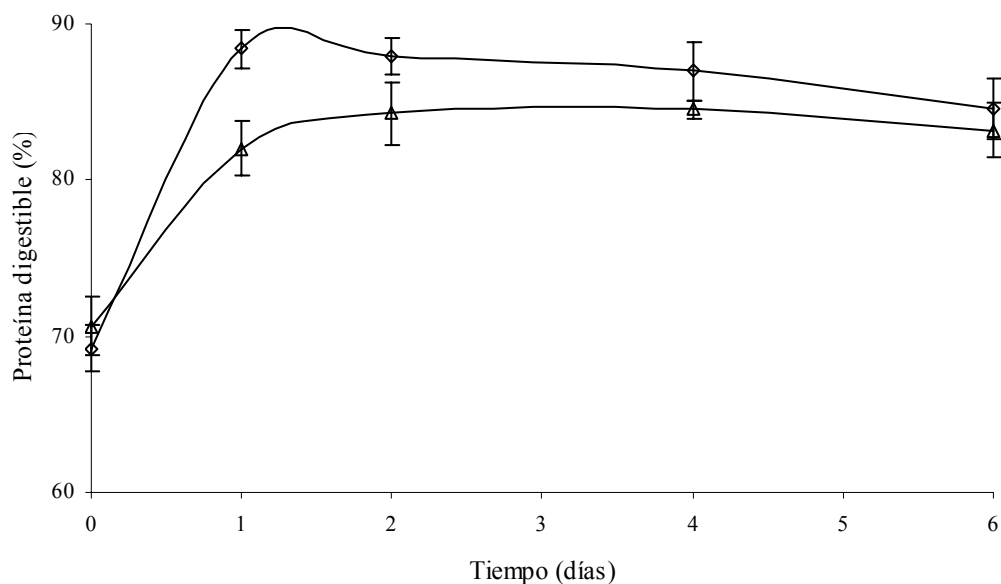


Figura 18.- Proteína digestible en pepsina y pancreatina en fermentaciones de mezcla de desechos de pescado adicionadas con 18% de melaza (p/p) base húmeda. Símbolos: Δ Control y ◇ inoculada con 5% (v/p) base húmeda de *Lactobacillus* sp. B2.

Los resultados de digestibilidad proteínica obtenidos en este estudio son superiores a los de otros reportes (Fagbenro y Jauncey, 1995; Vidotti y col., 2002) y similares a lo publicado por White y col. (1999). Además, para el caso de la presente investigación, los valores son

satisfactorios al compararlos con lo reportado para harina de pescado (92%), (Capetillo y *col.*, 2001). Esto último es relevante tomando en cuenta que la mayoría de los procesos de obtención de harina de pescado utilizan el pescado integro; no en este caso, en el que fue utilizada una mezcla de desechos del fileteado de pescado. Además, el proceso utilizado en el presente trabajo es más económico, no contaminante y no requiere de altos gastos de energía, como sucede en la producción de harina de pescado (Zahar y *col.*, 2002).

8.2. Escalamiento de la fermentación a nivel piloto.

La fermentación fue realizada en reactores de columna, habiéndose respetado en dos reactores (A y B) la misma relación longitud diámetro (L/D) igual a 2. La altura de empacado de esos reactores fue de 20 y 40 centímetros y la cantidad de carga (mezcla de desecho de pescado, melaza e inóculo) adicionada fue de 1.96 y 13.58 Kg para los reactores A y B, respectivamente (Sección 7.2.1., Tabla 3).

Adicionalmente fue utilizado un reactor de medida intermedia entre los reactores A y B, el cual fue identificado como reactor C y que presentó una relación (L/D) de 1. Este reactor fue empacado a una altura de 20 centímetros con 6.95 Kg de carga (mezcla de fermentación) (Tabla 3).

8.2.1. Análisis de licor liberado durante la fermentación.

8.2.1.1. Cambios en el pH y producción de ácido láctico.

En la mayoría de los tiempos de fermentación, los licores de los reactores B y C presentaron características de acidificación muy similares entre si y diferentes estadísticamente ($P < 0.05$) a los licores del reactor A (Figura 19, Tabla 8, Anexo 9). Por otra parte, durante los primeros 20 días de fermentación, los licores de los reactores A, B y C presentaron valores promedio de pH de 4.28, 4.32 y 4.37, respectivamente (Figura 19). Esto demuestra el establecimiento rápido de las condiciones ácidas, lo cual evita el crecimiento de los microorganismos dañinos (Owens y Mendoza, 1985).

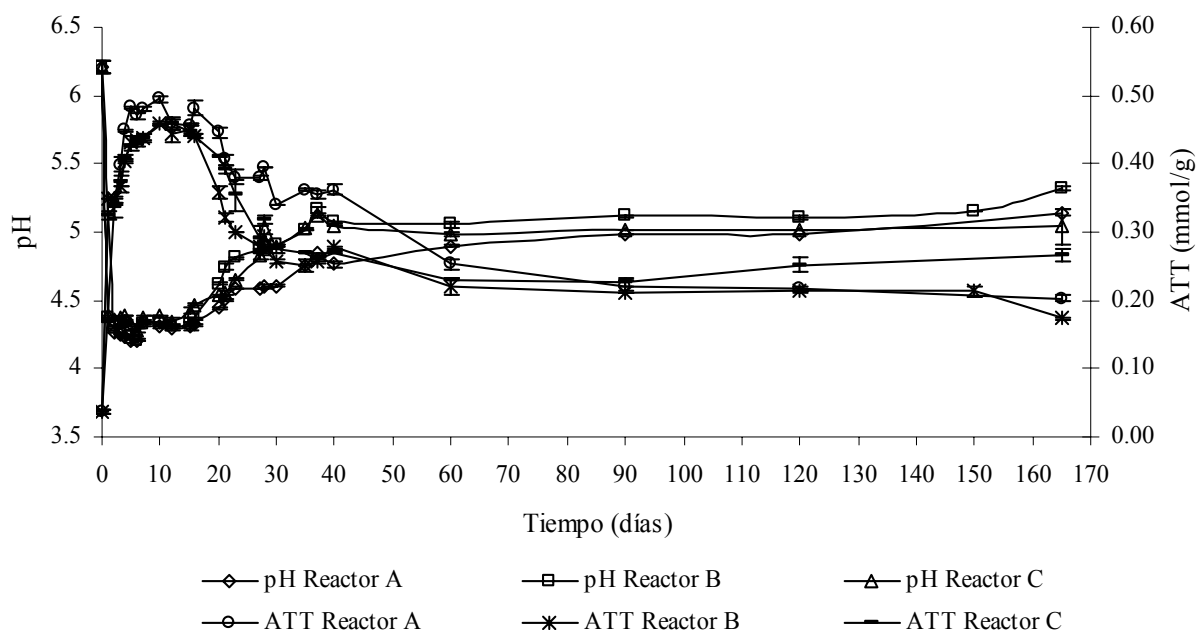


Figura 19. Producción de ácido láctico y cambios de pH en licores de fermentaciones de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Posteriormente, el pH de los licores incrementó lentamente hasta alcanzar valores de 4.6 en el reactor A y de 4.9 en los reactores B y C a los 30 días de fermentación. Al transcurrir el tiempo, el pH siguió aumentando en ambos sistemas para llegar a 4.98, 5.11 y 5.01 a los 120 días en los reactores A, B y C, respectivamente (Tabla 8). Estos valores se mantuvieron constantes hasta los 150 días de fermentación, tiempo en el que fueron destapados los reactores para llevar a cabo el primer muestreo y análisis de la fracción sólida.

El pH del ensilado puede disminuir durante la primera fase de la fermentación debido al dominio de las bacterias lácticas para alcanzar valores cercanos a 4.3. Sin embargo, este valor puede ser incrementado por el alto contenido de proteína en el ensilado que presenta capacidad amortiguadora y a los compuestos derivados de su hidrólisis como péptidos y aminoácidos con capacidad alcalinizante o también debido a la neutralización parcial del ácido por calcio (Faid y col., 1994; Fagbenro, 1996).

Inmediatamente después de muestrear la fracción sólida a los 150 días, los reactores fueron cerrados nuevamente para continuar la fermentación hasta los 165 días, observándose aumentos bruscos del pH en los licores para alcanzar cifras de 5.14, 5.32 y 5.04 en los reactores A, B y C, respectivamente (Figura 19).

Esos cambios fueron debidos muy probablemente a contaminación y penetración de oxígeno durante el muestreo de la fracción sólida, lo cual dió lugar al crecimiento de bacterias aeróbicas y hongos en la superficie. Esto último provocó el inicio de la descomposición de los ensilados; por lo que fue suspendida la fermentación a los 165 días.

En la Figura 19 y Tabla 8 también se puede observar que la acidez presentó un comportamiento relacionado inversamente a la evolución del pH, obteniéndose la mayor producción de ácido láctico a los 10 días en los tres reactores. Sin embargo, la fermentación en el reactor A fue más exitosa en cuanto a la concentración de ácido láctico, siendo diferente estadísticamente a los reactores B y C ($P < 0.05$) (Anexo 9). Estas diferencias pudieron ser debidas probablemente a que en los reactores B y C existió mayor compactación que en el reactor A debido a la cantidad de carga usada. Por otra parte, el volumen del espacio libre de cabeza de los reactores también pudo haber afectado la fermentación, siendo de 785, 6283 y 3142 cm³ para los reactores A, B y C, respectivamente.

Al final de la fermentación (165 días), los valores de ácido láctico fueron de 0.20, 0.17 y 0.26 mmol/g en los licores de los reactores A, B y C, respectivamente.

Los resultados obtenidos en el presente estudio concuerdan con lo reportado para fermentaciones de desechos de camarón, en donde se presentó un aumento gradual del pH de 4.1 a 5 después de 180 días de fermentación, aún habiendo frenado la autólisis a los 7 días cuando se registró el pH de 4.1 (Fagbenro, 1996).

Contrariamente a los hallazgos de la presente investigación, se ha reportado que los ensilados fermentados de desechos de gamba en un reactor agitado, presentaron una disminución mínima del pH a 5 con una producción de ácido láctico de 1.2% a las 48 h, observándose

enseguida un incremento del pH para llegar a 6.6 al final de la fermentación que tardó 144 h. Los autores atribuyeron estos cambios de pH a la capacidad amortiguadora del calcio solubilizado (Zakaria y col., 1998).

Tabla 8. Valores de pH y acidez total titulable en licores de fermentaciones de desechos de pescado elaboradas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Reactor	Análisis a diferentes tiempos de fermentación (días)											
	pH (5)	ATT (5)	pH (10)	ATT (10)	pH (20)	ATT (20)	pH (30)	ATT (30)	pH (40)	ATT (40)	pH (120)	ATT (120)
A	4.21c	0.48a	4.30c	0.49a	4.44c	0.45a	4.6b	0.34a	4.76b	0.36a	4.98b	0.22b
B	4.28b	0.43b	4.33b	0.46b	4.62a	0.36c	4.9a	0.26c	5.07a	0.28b	5.11a	0.21b
C	4.32a	0.42b	4.38a	0.45b	4.53b	0.41b	4.89a	0.27b	5.04a	0.27b	5.01b	0.25a

a, b y c: valores en cada columna con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Sin embargo; según Cira y col. (2002), ensilados de desechos de camarón fermentados en reactor de columna de 2 Kg y sin agitación, presentaron un valor de pH de 4.6 que se mantuvo casi constante durante 83 días de fermentación. Lo anterior no concuerda con lo reportado por (Zakaria y col., 1998) ni con los resultados de la presente investigación, lo cual se debe posiblemente a que las diferentes condiciones de fermentación, como la fuente de desecho pesquero, fuente de carbono, entre otros factores hacen que la acidificación sea diferente en cada proceso (Owens y Mendoza, 1985).

8.2.1.2. Cambios en el contenido de azúcares solubles totales.

En la Figura 20 se presenta el contenido de azúcares solubles totales en los licores de los ensilados a diferentes tiempos de fermentación. A partir de los primeros 3 días, la mayor parte de los azúcares fueron solubilizados y separados en la fracción líquida. La diferencia más importante en cuanto al contenido de azúcares se presentó durante los primeros 15 días de fermentación, siendo mayor el contenido en los licores obtenidos del reactor B.

Lo anterior fue causado principalmente por la mayor compactación presentada en el reactor B, debido a la cantidad de carga añadida. Después de los 15 días de fermentación, el contenido de azúcares continuó disminuyendo en ambos sistemas para llegar a valores entre 5 y 6 mg/g a los 60 días. Enseguida, esos valores permanecieron casi constantes en los tres fermentadores hasta el final de la fermentación. Lo anterior es de gran importancia, ya que las BAL requieren de azúcares fácilmente utilizables para que la fermentación sea exitosa (Hall, 2002).

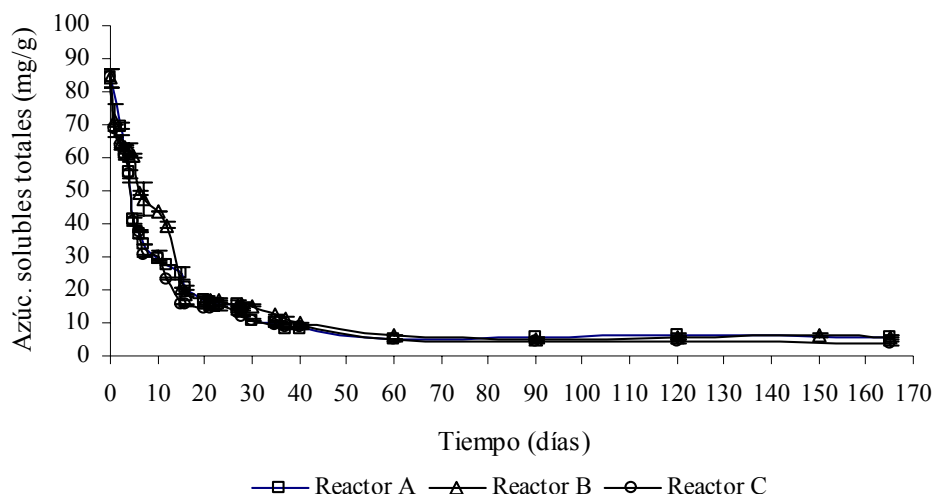


Figura 20. Contenido de azúcares solubles totales en licores de fermentaciones de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% (p/p) de melaza y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

8.2.1.3. Cuenta total de bacterias lácticas (BAL).

Las BAL requieren de vitaminas, aminoácidos y otros factores orgánicos de crecimiento, que al parecer se encuentran presentes en cantidades adecuadas en el pescado (Owens y Mendoza, 1985).

En la Figura 21 se muestra la cinética de crecimiento de las BAL determinadas en los licores del reactor B. Este último fue elegido para el análisis debido a presentar las mayores dimensiones y cantidad de carga añadida. La fase de crecimiento tardó 4 días cuando fueron incrementadas las cuentas de BAL de 8.4 a 13.7 ciclos logarítmicos de ufc/g. Este comportamiento estuvo relacionado con el incremento en la producción de ácido láctico durante los primeros días de fermentación debido al alto consumo de azúcares solubles presentes en la melaza (Figuras 19, 20 y 21).

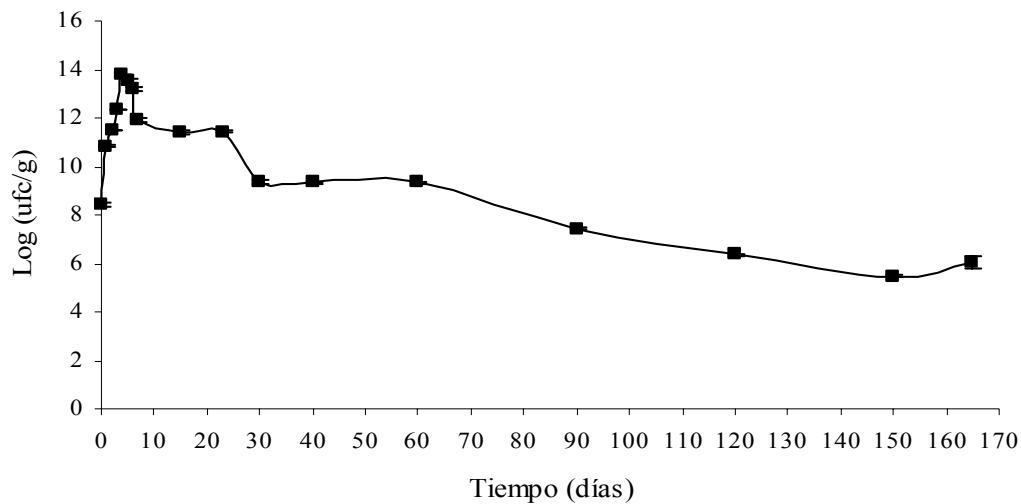


Figura 21. Cuenta total de bacterias lácticas en licor de fermentación de desechos de pescado realizada a nivel piloto en reactor de columna B (13.58 Kg), adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

La fase de muerte de las BAL fue muy lenta, existiendo al final de la fermentación 1.2×10^6 ufc/g. Lo anterior demuestra la capacidad de las BAL de sobrevivir y competir a las condiciones ácidas (pH entre 4 y 5) de la fermentación, llegando a ser la flora predominante entre la mayoría de las bacterias presentes en los alimentos bajo esas condiciones (Lücke, 1996).

Esto puede explicarse por la capacidad que presentan las BAL de producir además del ácido láctico, otros compuestos como bacteriocinas y peróxido de hidrógeno capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos (Einarsson y Lauzon 1995).

8.2.2. Análisis de la fracción sólida.

Una ventaja que ofrecen los reactores de columna utilizados en este trabajo en comparación con otros reactores estáticos, es que pueden obtenerse dos fracciones de la fermentación, el licor y la parte sólida, siendo esta última una fuente rica en proteínas, minerales y lípidos, la cual es utilizada principalmente para alimentación animal (Fagbenro y Jauncey, 1998; Vidotti y col., 2002), o en la formulación de medios de cultivo (Coello, 2002). El licor obtenido representa una fuente de proteína hidrolizada, minerales y carbohidratos el cual podría ser

caracterizado funcional e higiénicamente con la posibilidad de ser aplicado como aditivo en la elaboración de salsas u otros aditivos alimenticios para humanos.

8.2.2.1. Valores de pH y ATT.

Con el propósito de evitar la contaminación del producto y el desvío de la fermentación, los reactores permanecieron cerrados hasta cumplir 150 días, tiempo en el cual fueron destapados para muestrear la fracción sólida y evaluar su estabilidad, composición química y estimar el valor nutritivo de la misma.

La acidificación de los ensilados mostró diferencia significativa por efecto del tamaño de reactor ($P < 0.05$). Como puede observarse en la Tabla 9, el producto del reactor A presentó los mejores valores en cuanto a la producción de ácido láctico y pH, siendo diferente estadísticamente a los ensilados de los reactores B y C (Anexo 10). Los ensilados de los tres reactores presentaron valores de pH y ATT mejores que en los licores correspondientes. Esto muy probablemente fue causado por la pérdida de gran cantidad de agua de los ensilados durante la fermentación, lo cual aumentó el contenido de ácido láctico en la fracción sólida.

Tabla 9. Análisis de la fracción sólida de fermentaciones de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna, adicionadas con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Variables	Tipo de reactor y tiempo de fermentación (días)						
	A (150)	B (150)	C (150)	A (165)	B (165)	C (165)	A* (7)
pH	4.80c	5.01b	4.95b	5.16a	5.23da	5.34a	4.52d
ATT (mmol/g)	0.46b	0.39c	0.38c	0.35d	0.32e	0.31e	0.51a
Azúcares (mg/g)	6.72b	5.12d	4.95d	4.84d	5.77c	4.65d	30.32a
Aw	0.959b	0.955c	0.962ab	0.949d	0.943d	0.947d	0.963a
BAL (ufc/g)	2.2 X10 ⁶ b	4.9X10 ⁵ b	1.3X10 ⁶ b	1.0 X10 ⁶ b	1.4 X10 ⁶ b	2.3 X10 ⁶ b	7.2X10 ⁹ a

A* (7) = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.
a,b,c y d: Valores en cada fila con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Una vez transcurridos 150 días de fermentación, los ensilados de ambos reactores presentaron disminución en la producción de ácido láctico y por lo tanto aumento en el pH, lo cual fue

observado cuando estos fueron analizados a los 165 días. Esto se debió muy probablemente a la inhibición que pudieron sufrir las BAL por el aumento en la concentración de oxígeno durante el muestreo anterior (150 días); ya que en la mayoría de los casos, la presencia de oxígeno suprime el desarrollo de las BAL, siendo mucho más eficiente el uso de oxígeno por microorganismos con una cadena respiratoria funcional para la producción de energía (Lücke, 1996).

En la misma Tabla 9 se presentan los resultados de la fracción sólida del ensilado obtenidos a una semana de fermentación en el reactor A*. Los valores de acidificación en este ensilado fueron más altos que a tiempos largos, aún comparándolos con el ensilado obtenido en el fermentador del mismo tamaño. Estos resultados fueron satisfactorios y permitieron demostrar la posibilidad de obtener un producto estable a tiempos cortos.

8.2.2.2. Contenido de azúcares solubles totales.

Los azúcares solubles no fueron agotados completamente, siendo este un factor favorable para la viabilidad de las BAL durante el proceso fermentativo, ya que requieren de azúcares fermentables disponibles para su crecimiento y no pueden competir bien con otros microorganismos en alimentos que contienen bajo contenido de carbohidratos (Lücke, 1996). Los ensilados obtenidos del reactor A fueron superiores a los demás ensilados en cuanto al contenido de azúcares solubles totales, tanto a 7 como a 150 días de fermentación, con valores de 30.32 mg/g y 6.72 mg/g, respectivamente ($P < 0.05$) (Tabla 9, Anexo 10).

VI.2.2.3. Valores de actividad de agua (Aw).

Otro factor de gran importancia para el crecimiento microbiano es la actividad de agua, que en el caso de las bacterias requieren de valores más altos, seguidas por las levaduras y por último los mohos con valores mínimos de Aw. Con la excepción de bacterias halófilas, pocas bacterias crecen a valores de Aw por debajo de 0.9 y la mayoría muestran valores mínimos de Aw considerablemente altos para llevar a cabo su actividad biológica (Jay, 2000). Microorganismos dañinos como *Clostridium botulinum*, *Pseudomonas*, *Acitenobacter* y *Escherichia coli* requieren valores de Aw de 0.97 y 0.96 para los dos primeros y los dos últimos, respectivamente (Jay, 2000). Los valores mínimos de Aw para el crecimiento de BAL

varían considerablemente entre grupos, siendo generalmente más baja para especies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Enterococcus* que para especies de *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus* (Lücke, 1996).

La actividad de agua disminuyó considerablemente durante el proceso de 0.985 al inicio hasta valores de 0.946 a los 165 días de fermentación para los ensilados de los tres reactores, sin haber existido diferencia significativa entre ellos ($P>0.05$). Los ensilados del reactor A* presentaron la mayor A_w con un valor de 0.963, siendo superior estadísticamente a los demás ensilados ($P<0.05$). Sin embargo, según como lo establece Madigan y *col.* (2001), en todos los ensilados los valores de A_w fueron importantes para la supervivencia de las BAL y la inhibición de microorganismos dañinos, lo cual permitió mantener estable el producto.

8.2.2.4. Cuenta total de BAL.

Los resultados presentados en la Tabla 9 también muestran que las cuentas totales de BAL fueron iguales estadísticamente ($P>0.05$) en los ensilados de los tres reactores tanto a 150 como a 165 días de fermentación (Anexo 10). Sin embargo, la mayor sobrevivencia de BAL fue presentada en el ensilado del reactor A* a los siete días de fermentación y fue significativa ($P<0.05$) con 7.2×10^9 ufc/g, lo cual estuvo relacionado con los valores de ácido láctico y pH obtenidos. Por otra parte, las cuentas de BAL de la fracción sólida en los tres ensilados (A, B y C), fueron similares a las presentadas en el licor obtenido del reactor B (Figura 21).

Lo anterior fue debido probablemente a que en las BAL de los ensilados, predominaron los *Lactobacillus*, siendo éstos más resistentes a las condiciones ácidas que otros géneros de BAL, pudiendo tolerar valores de pH entre 4 y 5; de tal manera, su resistencia a la acidez les permitió mantenerse viables durante la fermentación láctica (Madigan y *col.*, 2001). Por otra parte, la cepa utilizada como inóculo (*Lactobacillus* sp. B2), originalmente fue aislada de desechos de camarón, lo cual muy probablemente le permitió sobrevivir en el ambiente de características parecidas como fueron los desechos de pescado (Shirai y *col.*, 2001).

Uno de los problemas principales que se presentan en fermentación láctica de desechos de pescado, es el crecimiento de hongos en la superficie del ensilado, por lo cual algunos autores han usado como método preventivo la adición de fungistáticos como el sorbato de potasio y propionato de sodio (Fagbenro, 1996; Fagbenro y Jauncey, 1998; Vidotti y *col.*, 2002). A pesar de que el tiempo de fermentación en el presente estudio fue largo, los ensilados obtenidos no mostraron signos de descomposición por hongos ni bacterias hasta alcanzar los 150 días de fermentación. Lo anterior puede ser explicado por el desplazamiento y salida del oxígeno en los reactores durante la fermentación.

8.2.2.5. Cambios de temperatura durante la fermentación.

Los procesos quimioheterótrofos son exotérmicos y la generación de calor por altos niveles de actividad microbiana dentro de los sólidos puede conducir a gradientes térmicos debido a la limitada capacidad de transferencia de calor que presentan los sustratos sólidos, lo cual podría ser dañino para la biomasa o formación de productos. Por otra parte; debido a la alta concentración de sustrato por unidad de volumen, lo cual es típico en fermentaciones en estado sólido, la generación de calor microbiano por unidad de volumen es mucho más grande que para cultivos líquidos (Prior y *col.*, 1992).

En el presente estudio, para realizar el escalamiento del proceso de fermentación, fueron colocados los reactores en un cuarto con temperatura controlada a 30°C. Durante el transcurso de la fermentación, la temperatura interna del producto fue registrada con termopares los cuales fueron colocados y distribuidos en cada uno de los reactores, de tal forma que hicieran contacto con la mezcla de fermentación.

En la Figura 22 se observa que, durante los primeros 30 días de fermentación, se presentaron temperaturas en promedio cercanas a 32°C en los ensilados de los tres reactores, sin observarse diferencias importantes entre cada uno de ellos. Después de los 30 días, la temperatura descendió para mantenerse casi constante con un valor muy cercano a 30°C. De modo que, durante todo el proceso de fermentación la temperatura promedio fue de 31.03 ± 0.28 , 31.65 ± 0.60 y 31.27 ± 0.45 °C, para los ensilados de los reactores A, B y C, respectivamente (Figura 22).

Lo anterior demuestra la estabilidad de la fermentación ácido láctica en cuanto a incrementos de temperatura que pudieran afectar el crecimiento y la actividad de las BAL. Además, las BAL son capaces de crecer y mantenerse activas en fermentaciones de desechos pesqueros, inclusive a temperaturas de 35°C (Zahar y col., 2002) y de 37°C (Ahamed y Mehendrakar, 1997).

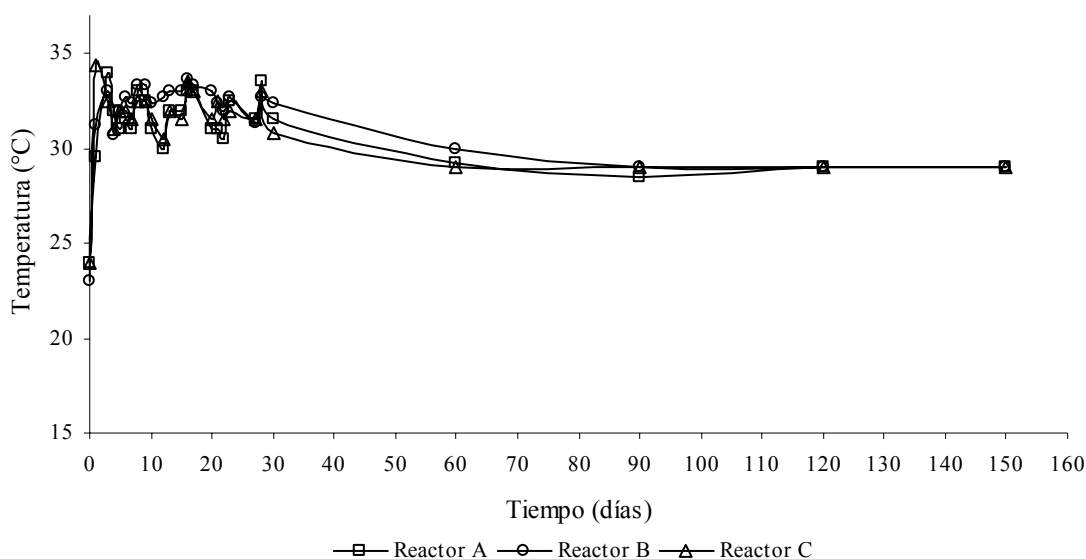


Figura 22. Comportamiento de la temperatura durante la fermentación ácido láctica de desechos de pescado realizada a nivel piloto en reactores de columna adicionada con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

8.2.2.6. Rendimiento de licor, producto sólido y ácido láctico.

Los resultados obtenidos muestran que, la cantidad de carga adicionada afectó la compactación de los ensilados y por lo tanto los rendimientos del licor liberado y la fracción sólida producida. En la Tabla 10 se puede observar que al final de la fermentación (165 días), el mayor rendimiento de licor fue presentado en el reactor B, debido a haber presentado la mayor cantidad de carga. Por lo tanto, el rendimiento de la fracción sólida en este reactor fue inferior al obtenido para los reactores A y C a tiempos largos de fermentación.

Contrariamente, del reactor A* se obtuvo el menor rendimiento de licor, debido a la poca carga adicionada y al corto tiempo de fermentación. Por otra parte, el rendimiento total de los

productos en los diferentes reactores fue de 93 a 97%, lo cual se debió principalmente a pérdidas por evaporación durante el proceso.

Tabla 10.- Rendimientos de licor y producto sólido de ensilados de desechos de pescado fermentados a nivel piloto durante 165 días en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Reactor	Cantidad de carga (Kg)	Licor producido (Kg)	Ensilado sólido producido (Kg)	Rendimiento de licor (%)	Rendimiento de sólido (%)	Rendimiento total (%)
A	1.96	1.05	0.78	53.57	39.79	93.36
B	13.58	8.63	4.57	63.54	33.65	97.20
C	6.85	3.99	2.56	58.28	37.37	95.66
A*	1.91	0.63	1.19	32.98	62.3	95.28

A* = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.

El porcentaje de azúcares consumidos estuvo relacionado con la eficiencia de la fermentación y por lo tanto con el rendimiento de ácido láctico producido. En la Tabla 11 se observa que en el reactor A se presentó el mayor porcentaje de azúcares consumidos y por lo tanto el mayor rendimiento de ácido láctico producido al compararlo con los reactores B y C a tiempos largos de fermentación.

Lo anterior permitió reafirmar que a menor escala es más efectiva la acidificación, sobre todo a tiempos prolongados de fermentación. Sin embargo, como fue discutido en la sección 8.2.1.1., a tiempos cortos de fermentación es posible obtener fermentaciones exitosas de los desechos pesqueros, aún a escala más grande. El rendimiento de ácido láctico a 7 días en el ensilado del reactor A* fue mucho mayor que los demás ensilados debido a que a ese tiempo existió mayor viabilidad de las BAL (Tabla 9, sección 8.2.2.4).

Tabla 11.- Azúcares consumidos y rendimiento de ácido láctico de ensilados de desechos de pescado fermentados a nivel piloto en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Reactor	Azúcares iniciales (g)	Azúcares consumidos (g)	Acido láctico producido (g)	Azúcares consumidos (%)	Rendimiento de ácido láctico (%)**
A	165.11	118.68	55.87	71.88	47.07
B	1144.23	774.81	353.77	67.71	45.66
C	576.791	390.57	169.41	67.71	43.37
A*	160.898	89.89	72.95	55.87	81.15

A* = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.

** = $[\text{Acido láctico producido (g)} / \text{Azúcares consumidos (g)}] \times 100$

8.2.2.7. Composición química proximal.

En la Tabla 12 es presentada la composición química proximal de la mezcla (desechos de pescado, melaza e inóculo) sin fermentar (tiempo 0); así como también de los ensilados producidos (fracción sólida) a 150 y 165 días de fermentación.

El contenido de humedad en los ensilados fue afectado significativamente por el tipo de reactor utilizado ($P < 0.05$) (Anexo 11). Como puede observarse en la Tabla 12, los ensilados del reactor A presentaron mayor contenido de humedad y el menor porcentaje fue presentado en el producto del reactor B tanto a 150 como a 165 días de fermentación. Esto puede ser explicado por la mayor compactación presentada en el reactor B, debido a la mayor cantidad de carga adicionada en comparación con los reactores A y C, lo cual permitió mayor liberación del licor durante la fermentación.

La proteína también se vió afectada significativamente, presentando el mayor porcentaje los ensilados de los reactores A y C y siendo iguales entre si ($P < 0.05$) (Anexo 11). El menor contenido de proteína lo presentó el producto del reactor B, debido muy probablemente a que junto con el licor fue separada mayor cantidad de compuestos derivados de la hidrólisis proteínica como consecuencia de la mayor compactación de la mezcla durante la fermentación.

Tabla 12. Composición química proximal (%) de desechos de pescado fermentados a nivel piloto en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Análisis (B.S.)	Tipo de reactor y tiempo de fermentación (días)						
	Mezcla (0)	A (150)	B (150)	C (150)	A (165)	B (165)	C (165)
Humedad	65.11a	50.26 b	45.95d	49.80 b	50.68 b	46.70d	48.26c
Proteína bruta*	37.54b	39.69a	37.33b	38.39a	38.33a	36.42b	36.54b
Lípidos	12.66d	26.99c	29.78a	29.54a	26.29c	31.91a	29.07b
Cenizas	19.71a	18.98b	20.97a	20.92a	20.52a	21.60a	22.93a
Fibra cruda	1.1a	0.91a	1.08a	0.88a	0.92a	0.89a	1.07a
E.L.N.	28.99	13.43	10.84	10.27	13.94	9.18	10.40

B.S. = Base seca.

(0) = Análisis a tiempo cero de fermentación.

* = N total x 6.25

a,b,c y d: Valores en cada fila con distinta letra difieren estadísticamente (P<0.05).

E.L.N.= Extracto libre de nitrógeno = 100 – (% proteína + % lípidos + % de cenizas + % de fibra cruda).

Aunque existió diferencia significativa (P<0.05) en el contenido de proteína entre los ensilados al inicio y final de la fermentación, los resultados obtenidos mostraron similitud y fueron satisfactorios. Por otra parte, la liberación del licor durante la fermentación se vió reflejada en la concentración de lípidos del producto, obteniéndose el mayor contenido de éstos en los ensilados de los reactores B y C con valores cercanos a 30%.

Sólo ligeras variaciones fueron observadas en el contenido de cenizas, sin existir cambios significativos por efecto del tamaño de reactor ni del tiempo de fermentación. Los ensilados presentaron valores de minerales cercanos a 20%, siendo un porcentaje considerable debido a que la materia prima presentó una alta porción de huesos, espinas y escamas. Además, la concentración de los minerales en la pasta pudo influir en el poder amortiguador durante la acidificación.

Contrariamente a lo anterior, el extracto libre de nitrógeno de los ensilados disminuyó de manera importante debido a la liberación de una gran cantidad de carbohidratos solubles en el licor, quedando en la fracción sólida aproximadamente un 38.9% del contenido inicial en la mezcla sin fermentar. Los carbohidratos residuales influyeron en las características sensoriales de los ensilados, enmascarando en gran parte el olor a pescado y dándoles un aroma dulce, lo cual puede hacerlos atractivos y palatables en alimentos para animales.

Por otra parte, la composición del ensilado obtenido del reactor chico A* (relación L/D de 2) a 7 días de fermentación, presentó un contenido de proteína, lípidos, cenizas y carbohidratos de 39.02, 20.19, 21.43 y 52.54

18.36% en base seca, respectivamente. Esto también confirma la posibilidad de obtener ensilados de pescado por este proceso con características químicas aceptables a tiempos de fermentación cortos.

8.2.2.8. Grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de la proteína.

El grado de hidrólisis y digestibilidad proteínica en la fracción sólida de los ensilados presentó diferencias significativas por efecto del tamaño de reactor ($P < 0.05$) (Anexo 12). En la Tabla 13 se presentan los resultados obtenidos, en donde se puede observar que los ensilados del reactor A tanto a tiempo corto (7 días) así como a tiempos largos (150 y 165 días) mostraron los valores más altos en grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de la proteína, lo cual estuvo relacionado con la producción de ácido láctico durante la fermentación (Tablas 9 y 11).

Como se ha mencionado anteriormente, los productos del reactor A presentaron los mejores valores de acidificación (Tablas 8 y 9). Esto pudo haber aumentado la actividad de las enzimas proteolíticas endógenas del pescado, así como también las proteasas producidas por las bacterias lácticas, dando lugar a un incremento del nitrógeno no proteínico y aminoácidos libres del sustrato durante la fermentación (Yin y col., 2005).

El tiempo de fermentación también afectó significativamente la hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de la proteína, ya que la mezcla de fermentación, antes de iniciar el proceso (tiempo 0),

presentó un grado de hidrólisis y digestibilidad de la proteína de 12.2 y 69%, habiéndose logrado un incremento aproximado de 76 y 15%, respectivamente. En los ensilados del reactor A, el incremento fue presentado tanto a los 7 como a los 150 días de fermentación (Tabla 13).

Tabla 13. Grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de proteínas de desechos de pescado fermentados a nivel piloto en reactores de columna, adicionados con 18% de melaza (p/p) y 5% (v/p) de *Lactobacillus* sp. B2.

Análisis	Tipo de reactor y tiempo (días)						
	A (150)	B (150)	C (150)	A (165)	B (165)	C (165)	A* (7)
Grado de Hidrólisis (%)	89.22 a	85.07b	86.77b	87.27a	81.99b	84.88b	88.29a
Digestibilidad de proteína (%)	84.15a	78.46c	81.61a	79.72b	77.02c	77.79c	85.37a

A* (7) = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.
a, b y c: Valores con distinta letra en cada fila difieren estadísticamente (P<0.05).

Los valores más bajos de hidrólisis y digestibilidad de la proteína fueron presentados en los ensilados de los reactores B y C, sin existir diferencia significativa entre ellos (P>0.05). Estos resultados fueron afectados por la menor acidez mostrada en sus ensilados y posiblemente a la separación de mayor cantidad de proteína digerida en los licores como consecuencia de la mayor compactación.

El contenido de proteína sin digerir no fue muy alto; sin embargo, puede estar relacionado con diversos factores como el pH, temperatura, tiempo de fermentación y la naturaleza de la materia prima (Hall y col., 1985). Esto último puede tener gran relación con los resultados obtenidos en este estudio, ya que los desechos de pescado usados muy probablemente presentaron gran contenido de proteína de escasa digestibilidad como colágeno y queratina. Sin embargo, el incremento en la hidrólisis y digestibilidad de la proteína reafirma la importancia de la fermentación ácido láctica como un medio de aprovechamiento de los desechos de pescado para darles un valor agregado.

8.2.2.9. Contenido de aminoácidos.

En la Tabla 14 se presenta el aminograma del ensilado obtenido a nivel piloto en el reactor de mayor capacidad. El producto presentó un contenido de histidina, treonina, metionina, valina e isoleucina casi igual comparado con la harina de pescado. Sin embargo, el contenido de glicina y tirosina fue mejor en el ensilado obtenido. Por otra parte, en su mayoría el contenido de aminoácidos fue cercano a la mitad de lo reportado para ensilado fermentado de residuos de tilapia (Vidotti y *col.*, 2003). Los mismos autores reportaron dos veces más ácido aspártico y ácido glutámico, y mucho menos tirosina que para el ensilado del presente estudio.

Tabla 14. Contenido de aminoácidos (g/100 g de proteína) del ensilado de pescado obtenido en comparación con harina de pescado.

Aminoácido	Ensilado de pescado	Harina de pescado
Ac aspártico	3.10	5.79
Ac. Glutámico	4.45	8.69
Serina	1.73	2.93
Histidina	1.85	1.28
Glicina	7.70	5.23
Treonina	2.39	2.85
Arginina	1.89	5.71
Alanina	5.20	4.41
Tirosina	4.33	1.99
Metionina	2.02	1.67
Valina	2.47	2.9
Fenilalanina	1.75	2.52
Isoleucina	2.39	2.59
Leucina	3.19	4.56
Lisina	2.19	3.89

También se ha reportado el aminograma de ensilado fermentado de desechos del procesamiento de surimi con valores superiores (Zinudheen y *col.*, 2008). Sin embargo, el contenido de aminoácidos esenciales (histidina, treonina, leucina e isoleucina, arginina, metionina y valina,) del ensilado obtenido, satisface los requerimientos para pollos y cerdos; aunque sólo los cuatro primeros cubren las necesidades para peces (Maynard y *col.*, 1981).

8.3. Evaluación del ensilado de pescado obtenido como ingrediente alimenticio para codornices (*Coturnix coturnix japónica*).

8.3.1. Evaluación de los parámetros productivos.

Fueron preparadas cuatro dietas con diferentes niveles de ensilado de pescado para alimentar codornices (*Coturnix coturnix japónica*) en etapa de crecimiento. La composición química proximal de las dietas experimentales es presentada en la Tabla 15, en la cual se observa que el contenido de proteína cruda fue similar en los cuatro alimentos. Según Gorrachategui, (1996), con ese contenido de proteína, son cubiertos los requerimientos de las codornices. Por otra parte, el porcentaje de lípidos y minerales fue mayor en las dietas con ensilado de pescado, lo cual fue debido al alto contenido de esos nutrientes en la materia prima utilizada, así como también en el producto (Tabla 12). El contenido en fibra cruda de las dietas fue bajo y reúne el requerimiento mínimo para codornices en crecimiento (Gorrachategui, 1996).

Tabla 15. Composición química proximal* de dietas experimentales para codornices (*Coturnix coturnix japónica*).

Componente	Nivel de inclusión de ensilado de pescado (%)			
	Control (0)	5	10	15
Humedad	10.92 ± 0.64	11.46 ± 0.97	11.31 ± 0.64	11.25 ± 0.32
Proteína cruda (N _{total} x 6.25)	21.1 ± 0.23	20.27 ± 0.54	21.02 ± 0.91	20.36 ± 0.07
Grasa cruda	3.78 ± 0.38	7.32 ± 0.62	7.74 ± 0.63	9.61 ± 1.14
Fibra cruda	3.35 ± 0.19	2.76 ± 0.29	2.62 ± 0.23	2.09 ± 0.28
Cenizas	9.79 ± 0.13	11.41 ± 0.10	12.29 ± 0.89	13.00 ± 0.56
Extracto libre de Nitrógeno	51.07	46.78	45.00	43.68

* = Datos expresados en por ciento (base húmeda)

Extracto libre de nitrógeno = 100 – [% de proteína + % de grasa + % de fibra cruda + % de cenizas].

En la Figura 23 se presenta la curva de crecimiento de codornices alimentadas con las cuatro dietas experimentales. Los resultados no mostraron diferencia significativa entre tratamientos (P>0.05) a los diferentes tiempos de análisis; aunque después de los 21 días, los alimentos con 10 y 15% de ensilado mejoraron el peso de las codornices.

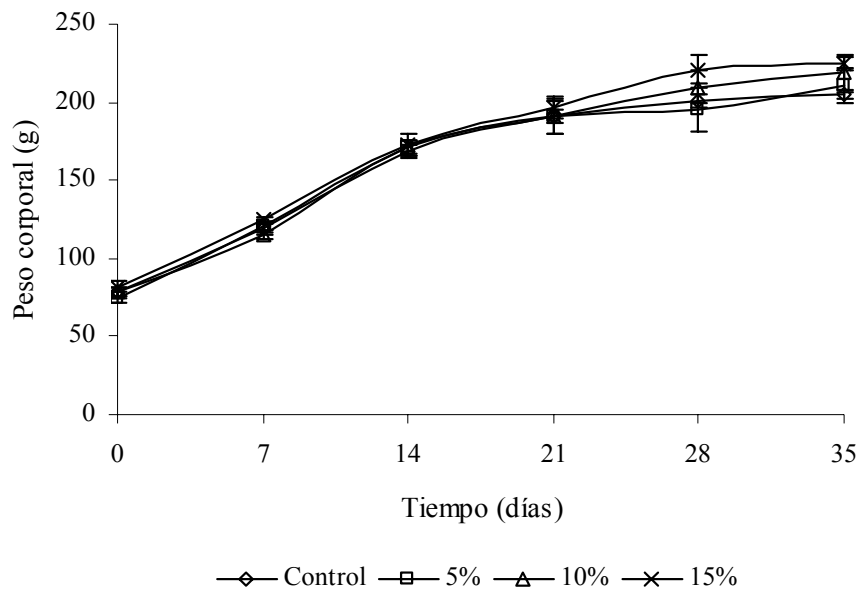


Figura 23. Curva de crecimiento de codornices (*Coturnix coturnix japonica*) alimentadas con dietas de diferentes niveles de ensilado de pescado.

En la literatura no se encontraron reportes sobre ganancia de peso en codornices para producción de carne usando ensilado de pescado en la dieta. Sin embargo, Vizcarra y col., (1999), observaron un comportamiento similar en pollos de engorda alimentados con dietas de diferentes niveles de ensilado de pescado, sin haber encontrado diferencia en el crecimiento. Por otra parte, Espe y col. (1992), demostraron que el desarrollo de pollos fue significativamente mejor cuando parte de la proteína en la dieta fue hidrolizada en forma de ensilado de pescado, atribuyendo a que en esa forma la proteína es más fácilmente utilizable para síntesis de proteína corporal por los animales.

El valor de conversión alimenticia acumulada fue diferente para cada una de las dietas en los distintos tiempos que trascurrió el estudio. Aunque no existió diferencia significativa entre tratamientos a cada tiempo ($P > 0.05$), el valor más satisfactorio para los cuatro alimentos resultó a los 14 días de experimentación (Tabla 16). Sin embargo, a los 21 días se obtuvieron resultados que son aceptables y concuerdan con lo recomendado por Gorrachategui, (1996) para esta línea de codornices. Por otra parte, a los 28 días de experimentación (49 días de edad) las aves presentaron valores de conversión alimenticia muy parecidos a los reportados

para codornices de la misma línea con una edad de 45 días (INRA, 1989). Para fines de este estudio, el experimento fue realizado hasta 35 días, obteniéndose los valores de conversión alimenticia más altos, lo cual no sería recomendable desde el punto de vista económico.

Tabla 16. Efecto del nivel de ensilado de pescado en la dieta sobre conversión alimenticia de codornices (*Coturnix coturnix japónica*) a diferentes tiempos de experimentación.

Nivel de ensilado en la dieta (%)	Tiempo de experimentación (días)				
	7	14	21	28	35
0	3.10 ± 0.24	2.92 ± 0.22	3.59 ± 0.14	4.51 ± 0.56	5.76 ± 0.50
5	3.65 ± 0.43	2.65 ± 0.17	3.38 ± 0.37	4.37 ± 0.32	5.48 ± 0.45
10	4.54 ± 0.27	2.71 ± 0.20	3.62 ± 0.41	4.23 ± 0.47	5.24 ± 0.55
15	4.07 ± 0.62	2.88 ± 0.36	3.54 ± 0.31	4.11 ± 0.28	4.99 ± 0.51

8.3.2. Rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne.

La inclusión del ensilado de pescado en el alimento no mostró efecto significativo sobre el rendimiento en canal de las codornices, obteniéndose porcentajes de 71.23±3.36, 71.74±2.59, 70.58±2.96 y 68.01±3.13 con las dietas control, 5, 10 y 15%, respectivamente. Asimismo, las características sensoriales de la carne de pechuga de codornices, no presentaron diferencia significativa entre tratamientos para todos los atributos evaluados (P>0.05) (Tabla 17).

Tabla 17. Efecto de diferentes niveles de ensilado de pescado en la dieta sobre la calidad sensorial de carne de codorniz (*Coturnix coturnix japónica*).

E.P. (%)	Atributo de calidad sensorial							
	Color	Olor	Olor desagradable	Sabor	Sabor desagradable	Blandura	Jugosidad	Calidad total
0	7.5 ± 1.2	7.8 ± 1.1	1.0 ± 1.6	7.2 ± 1.7	1.3 ± 1.7	7.2 ± 1.8	6.6 ± 1.9	7.5 ± 1.3
5	6.9 ± 1.6	8.0 ± 1.1	0.9 ± 1.9	7.3 ± 1.2	1.1 ± 1.5	7.7 ± 1.4	7.0 ± 1.4	7.5 ± 1.1
10	7.3 ± 0.9	7.4 ± 1.9	0.9 ± 1.4	7.4 ± 1.3	0.9 ± 1.4	7.7 ± 1.5	7.0 ± 1.4	7.6 ± 1.4
15	6.9 ± 1.5	7.1 ± 1.5	0.8 ± 1.3	6.8 ± 2.2	1.0 ± 1.2	7.9 ± 1.2	7.0 ± 2.0	7.5 ± 1.4

E.P. = Ensilado de pescado.

Escala de 1 a 9, donde 1 fue la más baja y 9 la más alta intensidad.

En la literatura no se encontraron reportes relacionados con el uso de ensilado de pescado en el alimento para codornices y su efecto sobre la calidad organoléptica de la carne. Sin embargo, Kjos y *col.* (2000) reportaron que en pollos de engorda, el alimento con 5% de ensilado y 1.7 ó 2.5% de aceite de pescado causó mal olor y sabor a la carne, detectándose sabor a pescado. Además, los mismos autores obtuvieron valores de intensidad del olor, sabor, jugosidad y blandura inferiores a los obtenidos en el presente estudio.

Por otra parte, los valores promedio de olor y sabor desagradable de la carne de codorniz fueron muy bajos (Tabla 17), inclusive en muchos casos no fueron detectados, en comparación a lo reportado para carne de pollo con valores hasta de 3 y 4 (Kjos y *col.*, 2000). Asimismo, los panelistas no detectaron en la carne sabor a pescado, lo cual demuestra la posibilidad de aplicar el ensilado de pescado hasta en un 15% en el alimento, sin tener efectos adversos sobre la calidad sensorial de la carne de codorniz.

9. CONCLUSIONES

En la presente investigación se demostró la posibilidad de valorar tres fuentes de desecho de pescado como lo fueron, especies de la FAC de nulo valor comercial, desechos de barracuda mexicana (*Sphyrna ensis*) y una mezcla de desechos del fileteado de diversas especies (MD) sin ningún tratamiento previo, para producir ensilados por medio de fermentación ácido láctica.

El nivel de melaza afectó significativamente la fermentación, resultando mejor con 18%. Además, los microsilos elaborados con cualquiera de las tres fuentes de desecho pesquero fueron aceptables en cuanto a acidificación y estabilidad del producto; sin embargo, los resultados de MD adicionada con 18% de melaza y 5% de *Lactobacillus* sp. B2 permitieron establecer las condiciones de fermentación y realizar el escalamiento a nivel piloto.

El escalamiento a 1.96, 6.85 y 13.58 Kg de carga en reactores de columna de acero inoxidable y de doble módulo, permitió obtener ensilados con valores de acidificación aceptables desde los dos primeros días de fermentación. Sin embargo, después de veinte días los productos de los reactores de mayor carga mostraron menor acidificación, aunque en los tres reactores los ensilados fueron conservados durante 150 días, presentando grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de proteína de 85.92% y 81.40%, respectivamente.

La inclusión de la fracción sólida del ensilado (0, 5, 10 y 15%) como fuente de proteína predigerida en el alimento para codornices (*Coturnix coturnix japónica*), produjo valores de conversión alimenticia satisfactorios a los 35, 42, y 49 días de edad sin mostrar diferencia significativa entre las dietas. Asimismo, el rendimiento en canal y calidad sensorial de la carne de pechuga no fueron diferentes usando los cuatro alimentos. Además, la carne no presentó olor ni sabor a pescado habiendo sido aceptada satisfactoriamente por los jueces.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de los desechos de pescado que pueden ser transformados mediante fermentación ácido láctica en ensilados, adquiriendo alto valor agregado y minimizando los problemas de impacto ambiental. Asimismo, los hallazgos afirman el valor nutritivo de los ensilados de pescado cuando son aplicados en la producción de codornices sin mostrar efectos sensoriales negativos en la carne.

10. PERSPECTIVAS

El presente trabajo de investigación abre la posibilidad de realizar varios estudios de aplicación del producto obtenido como ingrediente alimenticio en diversas especies animales acuícolas y terrestres.

Además, el ensilado obtenido puede ser evaluado como fuente de peptona en la formulación de medios de cultivo, lo cual puede ayudar a disminuir los costos. Así como también, valdría la pena evaluar el producto como sustrato para producción de bacteriocinas.

Por otra parte, el licor obtenido de la fermentación puede ser valorado en cuanto a sus características higiénicas y nutricionales, con el objeto de evaluar su posible uso como salsa de pescado.

Asimismo, el proceso de producción de ensilados establecido en la presente investigación, podría ser estudiado para la obtención, aislamiento y caracterización de péptidos y otras biomoléculas con actividad biológica.

11. TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES

Los resultados del presente trabajo de investigación han sido presentados en cinco congresos nacionales y uno internacional, así como también se impartió una conferencia y un artículo científico fue publicado en una revista indizada. Asimismo, se hizo una estancia-curso de adiestramiento a nivel internacional.

Artículo:

“Utilization of fisheries by-catch and processing wastes for lactic acid fermented silage and evaluation of degree of protein hydrolysis and *in vitro* digestibility”. 2008. *Revista Mexicana de Ingenieria Quimica* 7(3):195-204 (Anexo).

Congresos:

“Establecimiento de condiciones de fermentación láctica de desechos de pescado”. X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 8-12 de Septiembre del 2003, Puerto Vallarta, Jalisco.

“Establecimiento de condiciones para la fermentación ácido láctica de desechos de pescado utilizando melazas”. Primer foro de investigación del Centro de Estudios Tecnológicos Industrial y de Servicios No. 100. 22-24 de Octubre del 2004, Tepic, Nayarit.

“Efecto antifúngico del quitosano en ensilados de pescado”. III Simposio Iberoamericano de Quitina. 27-29 de Septiembre del 2004, Córdoba, España.

“Conservación de desechos de pescado por fermentación láctica como una alternativa potencial en alimentación animal”. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 19-23 de Septiembre del 2005, Mérida, Yucatán.

“Efecto antifúngico de quitosano con diferentes pesos moleculares en fermentación de desechos de pescado”. XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 19-23 de Septiembre del 2005, Mérida, Yucatán.

“Fermentación láctica de desperdicios de atún (*Thunus* spp.) y desperdicios de bicuda (*Sphyraena ensis*) utilizando papaya y melazas como fuentes de carbono para la obtención de hidrolizados proteicos”. VI Congreso del Noroeste y II Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. 14 al 17 de Noviembre del 2006. Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.

“Estudios de escalamiento de fermentación ácido láctica de desechos de pescado a nivel piloto”. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 25-29 de Junio del 2007, Morelia, Michoacán.

Conferencia:

“La Biotecnología como una alternativa para el aprovechamiento de subproductos acuícolas”. Semana Nacional de la Ciencia y la Tecnología. Centro de Estudios Tecnológicos Industrial y de Servicios No. 100. Octubre 25 del 2004, Tepic, Nayarit.

Estancia-Curso:

“Biopolymers in Materials and Life Sciences”. 10-28 de Enero del 2005. Universidad de Concepción, Chile.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 27:1256-1262.
- Adler-Nissen, J. (1993). *Enzymes in food processing*. Elsevier Applied Science Publishers. New York.
- Ahamed, J. y Mahendrakar, N.S. (1997). Chemical and microbial changes in fish viscera using fermentation ensiling at different temperatures. *Bioresource Technology*. 59:45-46.
- Anónimo. (2003). Anuario estadístico de pesca. SAGARPA. Gobierno de México.
- AOAC. (1990). *Methods of Analysis* (15th ed.). Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Arason, S. (1994). Production of fish silage. En: *Fisheries processing, Biotechnological applications*. (A.M. Martin, edit.), Pp. 244-272. Chapman & Hall, Londres.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (Salminen, S. y Wright, A. von, eds.), 2nd edition. Pp. 1-72. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Baek, H.H. y Cadwallader, K.R. (1995). Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-products. *Journal of Food Science*. 60(5):929-935.
- Barroga, A.J., Pradhan, R. y Tobioka, H. (2001). Evaluation of fish silage-sweet potato mixed diet with Italian ryegrass silage as basal ration on nitrogen utilization and energy balance in growing lambs. *Journal of Animal Science*. 72(3):189-197.
- Bárzana, E. y García, M. (1994). Production of fish protein concentrate. En: *Fisheries processing, Biotechnological applications*. (A.M. Martin, edit.), Pp. 206-222. Chapman & Hall, Londres.
- Benjakul, S. y Morrisey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 45:3423-3430.
- Bermúdez, J.E., Rodríguez, J.H., Ocampo, A., y Peñuela, L. (1999). Ensilaje de vísceras de pescado Cachama blanca (*Piaractus brachiponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos en una dieta con aceite crudo de palma. *Livestock Research for Rural Development*. 11(2).

-
-
- Bozoglu, T.F., y Ray, B. (1998). Lactic acid bacteria. Current advances in metabolism, genetics and applications. Vol. 98, NATO ASI Series, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- Bulut, C., Gunes, H., Okuklu, B., Harsa, S., Kilic, S., Coban, H.S, y Yenidunya, A.F. (2005). Homofermentative lactic acid bacteria of a traditional cheese, comlek peyniri from Cappadocia region. *Journal of Dairy Research*.72:19-24.
- Cabello, A.M., Martínez, Z., Villegas, L.V., Figuera B.E., Marcano, L.A., Gómez, A. y Vallenilla, O. (2005). Fauna acompañante del camarón como materia prima para la elaboración de productos pesqueros. *Zootecnia Tropical*. 23(3):217-230.
- Calsamiglia, S. y Stern, M.D. (1995). A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminant. *Journal of Animal Science*. 73:1459-1465.
- Capetillo, C.M., Abreu, J.E. y Belmar, R. (2001). Estandarización de un método *in vitro* para la predicción de nitrógeno digestible en ingredientes de dietas para cerdos. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 5(4):373-377.
- Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28(4):281-370.
- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. y Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 37:1359-1366.
- Cira, L.A. (2000). Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Coello, N., Montiel, E., Concepción, M. y Christen, P. (2002) Optimization of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*. 85:207-211.
- Davison, P. y Hoover, D. (1993). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic acid bacteria*. (S. Salminen y A. von Wright, eds.), Pp. 127-158, Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- Dong, F.M., Fairgrieve, D.I., Skonberg, D.I. y Rasco, B.A. (1993). Preparation and nutrient analyses of lactic acid bacterial ensiled salmon viscera. *Aquaculture*. 109:351-366.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Robers, P.A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related sugars. *Analytical Chemistry*. 28:350-

356.

- Einarsson, H. y Lauzon, H.L. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 61 (2):669-676.
- Enes Dapkevicius, M.L.N., Batista, I., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M. y Houben, J.H. (1998). Lipid and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. *Food Chemistry*. 63(1):97-102.
- Enes Dapkevicius, M.L.N., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M., Houben, J.H. y Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 57:107-114.
- Enes Dapkevicius, M.L.N., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M. y Houben, J.H. (2007) Preservation of blue-jack mackerel (*Trachurus picturatus* bowdich) silage by chemical and fermentative acidification. *Journal of Food Processing and Preservation*. 31(4)454–468.
- Espe, M., Haaland, H. y Njaa, L.R. (1992). Substitution of fish silage protein and a free amino acid mixture for fish meal protein in a chicken diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 58:315-319.
- FAO, (2004). Global production statistics. Yearbooks of Fishery Statistics Summary Tables.
- Fagbenro, O. y Jauncey, K. (1995). Growth and protein utilization by juvenile catfish (*Clarias gariepinus*) fed dry diets containing co-dried lactic-acid-fermented fish silage and protein feedstuffs. *Bioresource Technology*. 51:29-25.
- Fagbenro, O.A. (1996). Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*. 29(7):595-599.
- Fagbenro, O.A. y Jauncey, K. (1998). Physical and nutritional properties of moist fermented fish silage pellets as a protein supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology*. 71:11-18.
- Faid, M., Karani, H., Elmarrakchi, A. y Achkari-Begdouri, A. (1994). A biotechnological process for the valorization of fish waste. *Bioresource Technology*. 49:237-241.
- Finch, R. (1977). Whatever happened to fish protein concentrate. *Food Technology*. 31(5):44-53.
- Froese, R. y Pauly D. (2008). FishBase, World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, versión (10/2008).

-
-
- Gimeno, M., Martínez-Ibarra, C., Pacheco, N., García-Arrazola, R., Bázquez, E., Shirai K. One-solvent Extraction of Astaxanthin from Lactic acid Fermented Shrimp Wastes. 2007. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:10345–10350.
- Gorrachategui, M. (1996). Alimentación de aves alternativas: *Codornices, faisanes y perdices*. En: XII Curso de especialización FEDNA. Avances en nutrición y alimentación animal. (Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal, ed.). Pp. 161-198, Madrid, España.
- Guadix, A., Guadix, E. y Páez-Dueñas, M. (2000). Procesos tecnológicos y métodos de control en la hidrólisis de proteínas. *Ars Pharmaceutica*. 41:79:89
- Guerouali, A., Zahar, M. y Benkerroum, N. (1995). Preparation and utilization of fish silage as feed supplement for ruminants. *Annales de Zootechnie*. 44 (suppl.1):102.
- Hall, G.M., Ledward, D.A. y Lawrie, R.A. (1985). Silage from tropical fish 2. Undigested fraction. *Journal of Food Technology*. 20:573-580.
- Hall, G.M. (2002). Lactic acid bacteria in fish preservation. En: *Safety and quality issues in fish processing*. (H.A. Bremner, edit.). 1st edition. Pp. 330-347, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. England.
- Han-Ching, L., In, T., Mauguin, S. y Mescle J.F. (1992). Application of lactic acid fermentations. En: *Fish Processing Technology*. (G. M. Hall, edit). Pp. 193-208. Blackie Academic and Professional, Londres.
- Haard, N.F., Kariel, N., Herzberg, G., Woodrow, L.A. y Winter, K. (1985). Stabilization of protein and oil in fish silage for use as a ruminant feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 36:229-241.
- Haard, N.F. y Simpson, B.K. (1994). Proteases from aquatic organisms and their uses in the seafood industry. En: *Fisheries processing, Biotechnological applications*. (A.M. Martin, edit.), Pp. 132-154. Chapman & Hall, Londres.
- Hassan, T.R. y Heath, J.L. (1987). Chemical and nutritive characteristics of fish silage produced by biological fermentation. *Biological Wastes*. 20:187-201.
- Hernández, B. E. (2003). Caracterización fisicoquímica, reológica y funcional de fracciones peptídicas obtenidas a partir de la hidrólisis enzimática de proteínas del músculo de mero (*Epinephelus morio*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.

-
-
- Holo, H., Jeknic, Z., Daeschel, M., Stevanovic, S. y Nes, I. F. (2001). Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics. *Microbiology*. 147: 643-651.
- Horn, S.J., Aspino, S.I. y Eijsink, V.G.H. (2005). Growth of *Lactobacillus plantarum* in media containing hydrolysates of fish viscera. *Journal of Applied Microbiology*. 99:1082-1089.
- Horner, W.F.A. (1997). Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking). En: *Fish Processing Technology*. (Hall, G.M. dir), 2th edition. Pp. 32-72, Blackie Academic and Professional, United Kingdom.
- INRA, (1989). L' alimentation des animaux monogastriques: porc, lapin, volailles. (Institut National de la Recherche Agronomique, INRA, edit), 2^a edition, Pp. 137-140, Paris, Francia.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. y Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiology Review*. 59:171-200.
- Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied Environmental Microbiology*. 44: 525-532
- Jay, J.M. (2000). Modern food microbiology. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Kim, C.R., Hearnberger, J.O. y Eun, J.B. (1995). Gram-negative bacteria in refrigerated catfish fillets treated with lactic culture and lactic acid. *Journal of Food Protection*. 58 (6): 639-643.
- Kristinsson, H.G. y Rasco, B.A. (2000). Fish protein hydrolysates production, biochemical and functional properties. *Critical Review of Food Science and Nutrition*. 40(1):43-81.
- Kjos, N.P., Herstad, O., Overlad, M. y Skrede, A. (2000). Effects of dietary fish silage and fish fat on growth performance and meat quality of broiler chicks. *Canadian Journal of Animal Science*. 80 (4): 625-632.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70:337-349.
- Lázaro, R., Serrano, M.P. y Capdevila, J. (2005). Nutrición y alimentación de avicultura complementaria: *Codornices*. En: *XXI Curso de especialización FEDNA. Nutrición y alimentación de codornices*. (Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal, ed.). Pp. 369-408, Madrid, España.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of head of

-
-
- bacteriophage T4. *Nature*. 277:680-685.
- Lassen, T.M. (1994). Evaluation of conditions for fermentation of fish offal. *Agricultural Science in Finland*. 4:11-17.
- Levin, R.E. (1994). Lactic acid and propionic acid fermentations of fish hydrolyzates. En: *Fisheries processing, Biotechnological applications*. (A.M. Martin, ed.), Pp. 273-210. Chapman & Hall, Londres.
- Lian, P.Z., Lee, C.M. y Park, E. (2005). Characterization of squid-processing byproduct hydrolysate and its potential as aquaculture feed ingredient. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:5587-5592.
- Liceaga-Gesualdo, A.M. y Li-Chan, E.C.Y. (1999). Functional properties of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*) *Journal of Food Science*. 64 (6):1000-1004.
- Li, P., Wang, X., Hardy, R.W. y Gatlin, D.M. (2004). Nutritional value of fisheries by-catch and by-products meals in the diet of red drum. *Aquaculture*. 236:485-496.
- Lonsane, B.K., Saucedo-Castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra González, G., Ghildyal, N.P., Ramakrishna, M. y Krishnaiah, M.M. (1992). Scale-Up Strategies for Solid State Fermentation Systems. *Process Biochemistry*. 27:259-273.
- Lücke, F.K. (1995). Indigenous lactic acid bacteria of various food commodities and factors affecting their growth and survival. En: *Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications*. (T.F. Bozoglu y B. Ray, eds.), Pp. 219-252. Springer-Verlag, Germany.
- Mc Donald, P.R.A., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. y Morgan, C.A. (1999). *Nutricion animal*, 5ª Ed., Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J.B. (2001). *Biology of Microorganisms*. 8th edit, Prentice Hall Iberia, Madrid, España.
- Mackie, I.M. (1997). Methods of identifying species of raw and processed fish. En: *Fish Processing Technology*. (G.M. Hall, edit.). 2th edition, Pp. 161-199. Blackie Academic and Professional, United kingdom.
- Mahmoud, M.I., Malone, W.T. y Cordle, C.T. (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science*. 57:1223-1229.
- Martin, A.M. (1996). Role of lactic acid fermentation in bioconversion of wastes. En: *Lactic*

-
-
- acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and application.* (T.F. Bozoglu y B. Ray, eds.), Pp. 219-252, Springer-Verlag, Germany.
- Matsumoto, Y., Saucedo-Castañeda, G., Revah, S. y Shirai K. (2004). Production of N acetylhexosaminidase of *Lecanicillium lecanii* by solid state and submerged fermentations utilizing shrimp waste silage as substrate and inducer. *Process Biochemistry*. 39(6):665-671.
- Maynard, L.A., Loosli, J.K., Hintz, H.F. y Warner, R.G. (1981). Nutrición animal. 4ª edición, Pp. 155-159. McGRAW-HILL, México.
- Mitchel, D.A. y Lonsane, B.K. (1992). Definition, characteristics and potencial. En: *Solid substrate cultivation*. (H.W. Doelle, D.A. Mitchell y C.E Rolz, eds.). Pp. 1-13. Elsevier Science publishers, England.
- National Research Council. (1994). *Nutrient requirements of poultry*. 9th rev. National Academy Press, Washington, D.C.
- Neave, R.V.H. (1986). Introducción a la tecnología de productos pesqueros. 1ª. Edición. Continental, México,
- Nousiainen, J. y Setälä, J. (1998). Lactic acid bacteria as animal probiotics. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (S. Salminen y A. von Wright, eds.). 2nd edition, Pp. 437-474. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Ockerman, H.W. y Hansen, C.L. (1994). Industrialización de subproductos de origen animal: *Subproductos pesqueros*. 2ª Edición, Pp. 291-320, Acribia. Zaragoza, España,
- Ouwehand, A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (S. Salminen y A. Von Wright, eds.). 2nd edition, Pp. 139-160. Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Owens, J.D. y Mendoza, L.S. (1985). Enzymatically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *Journal of Food Technology*. 20:273-293.
- Pastoriza, L., Sampedro, G., Cabo, M.L., Herrera, J. y Bernárdez, M. (2003). Solubilisation of proteins from rayfish residues by endogenous and commercial enzymes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84:83-88.
- Prior, B.A., Du Preez, J.C. y Rein, W. (1992). Environmental parameters. En: *Solid substrate cultivation*. (H.W. Doelle, D.A. Mitchell y C.E. Rolz, eds.), Pp. 65-68. Elsevier Science publishers. England.

-
-
- Poernomo, A. y Buckle, K.A. (2002). Crude peptones from cowtail ray (*Trygon sephen*) viscera as microbial growth media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 18:333-340.
- Plascencia, J.M., Olvera, M.A., Arredondo, J.L.A. y Shirai, K. (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysates in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:753-759.
- Quintero, R. (1981). Ingeniería Bioquímica, Teoría y aplicaciones. 1ª. Edición, Alambra Mexicana, México.
- Raa, J. y Gildberg, A. (1982). Fish silage: A review. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*. 16:383-419.
- Ravallec, P.R., Charlot, C., Pires, C., Braga, V., Batista, I., Van, W.A., Le, G.Y. y Fouchereau, P.M. (2001). The presence of bioactive peptides in hidrolysates prepared from processing waste of sardine (*Sardine pilchardus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81:1120-1125.
- Ray, B. (1996). Probiotics of lactic acid bacteria: Science or myth. En: *Lactic acid bacteria: current advances in metabolism, genetic and applications*. (T.F. Bozoglu y B. Ray, eds.), Pp. 100-135. Springer, Germany.
- Ray, B. (2001). *Fundamental Food Microbiology*. 2nd Edition, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. y Gorbach S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. En: *Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects*. En: (S. Salminen, y A. von Wright, eds.), 2nd edition. Pp. 211-254, Marcel Dekker Inc. New York, USA.
- Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. 47:125-137.
- Shirai, K. (1999). Utilización de desechos de camarón para recuperación de quitina, proteína y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González, R.O. y Hall, G.M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microbial Technology*. 28: 446-452.

-
-
- Szakács, G., Radvánszky, B. y Gyenes, J. (1988). Large-scale production of animal feed from meat industry by-products by lactic acid fermentation. En: *Biotechnology and Food Industry*, Proc Int Symposium. Pp. 609-615, Budafest.
- Torres, M.R. (2002). Flora intestinal, probióticos y salud. Segunda edición, Formas finas (edit). Guadalajara, Jal.
- Tungkawachara, S., Park., J.W. y Choi, Y.J. (2003). Biochemical properties and consumer acceptance of pacific whiting fish sauce. *Journal of Food Science*. 68(3):855-860.
- Van Wyk, H.J. y Heydenrych, C.M.S. (1985). The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 36:1093-1103.
- Vázquez-Ortiz, F.A., Caire, G., Higuera-Ciapara, I. y Hernández, G. (1995). High Performance Liquid Chromatographic Determination of Free Amino Acids in Shrimp. *Journal of Liquid Chromatography*. 18(19):2059-2068.
- Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A., (2005). Peptones from autohydrolysed fish viscera for nisin and pediocin production. *Journal of Biotechnology*. 112:299-311.
- Viana, M.T., López, L.M., Esquivel, Z.G. y Mendez, E. (1996). The use of silage made from fish and abalone viscera as an ingredient in abalone feed. *Aquaculture*. 140:87-98.
- Vidotti, R.M., Carneiro, D.J. y Viegas, E.M. (2002). Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(1):57-62.
- Vidotti, R.M., Macedo, E.M. y Carneiro, D.J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*. 105:199-204.
- Vizcarra, L.A., Avila, E. y Sotelo, A. (1999). Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79: 1915-1922.
- Wang, S.L. y Hwang, J.R. (2001). Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. *Enzyme Microbial Technology*. 28:376-382.
- Weinberg, Z.G. y Ashbell, G. (2003). Engineering aspects of ensiling. *Biochemical Engineering Journal*. 13:181-188.
- White, M.B., Anderson, D.M. y Rouvinen, K.I. (1999). Apparent digestibility coefficients of

-
-
- raw ground, acid and fermented silver hake (*Merluccius bilinearis*) feedstuffs for mink and evaluation of the storage stability of the silages. *Canadian Journal of Animal Science*. 375-381.
- Yin, L.J., Tong, Y.L., Jiang, S.T. (2005). Improvement of the functionality of minced mackerel by hydrolysis and subsequent lactic acid bacterial fermentation. *Journal of Food Science*. 70:172-178.
- Zahar, M., Benkerrow, N., Guerouali, A., Laraki, Y. y Yaboudi, K.E. (2002). Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. *Bioresource Technology*. 82:171-176.
- Zakaria, Z., Hall, M. y Shama, G. (1998). Lactic acid fermentation of scampi waste in a rotating horizontal bioreactor for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 3:4-11.
- Zinudheen, A.A., Anandan, R. y Ramachandran, G. (2008). Effect of dietary supplementation of fermented fish silage on egg production in Japanese quail (*Coturnix coromandelica*). *African Journal of Agricultural Research*. 3(5):379-383.

ANEXOS

ANEXO 1

Curva estándar para determinación de carbohidratos solubles totales (Método fenol-ácido sulfúrico, Dubois y *col.*, 1956).

Reactivos:

Fenol al 5%. Pesar 5 g de fenol (cristales) disolverlos completamente y aforar a 100 ml con agua destilada.

Acido sulfúrico concentrado.

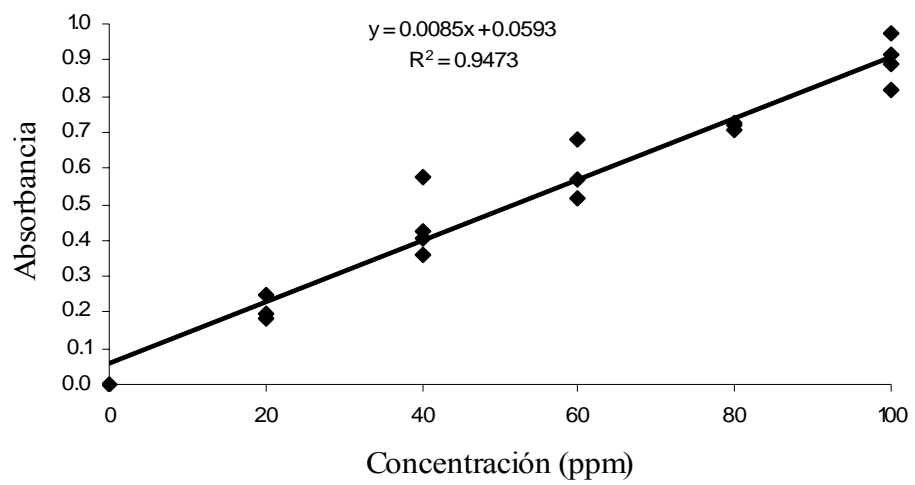
Solución estándar de glucosa 100 µg/ml (ppm). Se pesan 100 mg de glucosa grado reactivo, se disuelven en agua destilada y se afora a un volumen de 1000 ml.

Curva estándar

A partir de la solución estándar de glucosa (100 µg/ml) se preparó la curva estándar como se describe a continuación.

Volumen del estándar (ml)	Volumen de agua (ml)	Concentración del estándar (µg/ml)
0.0	1.0	0
0.2	0.8	20
0.4	0.6	40
0.6	0.4	60
0.8	0.2	80
1	0.0	100

A cada tubo le fue adicionado 1 ml de fenol al 5% e inmediatamente fueron agregados con cuidado 5 ml de ácido sulfúrico concentrado. Se mezcló perfectamente en vórtex y se dejó reposar durante 10 minutos. La absorbancia de la mezcla fue medida a 490 nm.

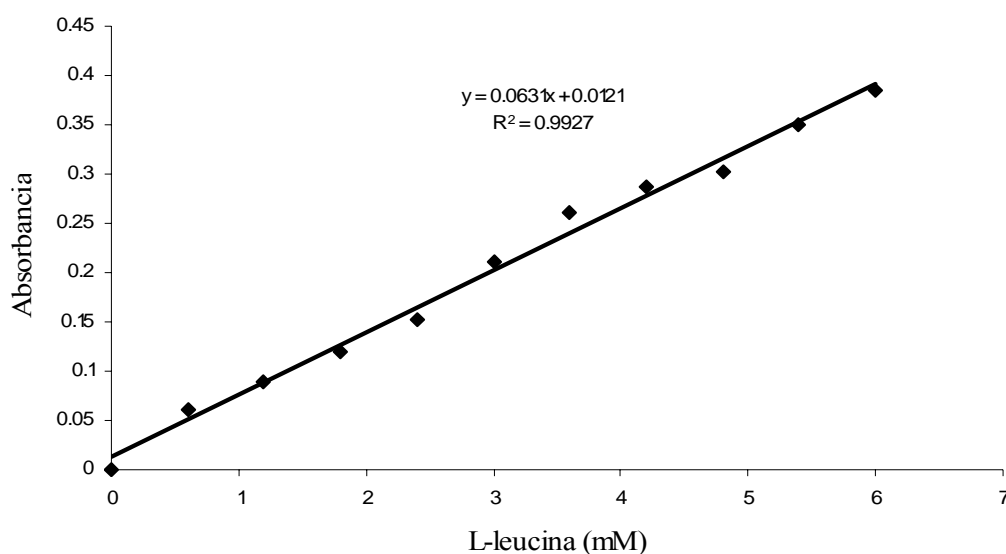


Curva estándar para determinar azúcares solubles totales

ANEXO 2

Curva estándar de L-leucina para determinar grado de hidrólisis de proteínas.

Para obtener la curva estándar se preparó una solución patrón 6 mM de L-leucina y a partir de ésta se prepararon las siguientes diluciones: 0.6, 1.2, 1.8, 2.4, 3.0, 3.6, 4.2, 4.8 y 5.4 mM. En tubos ámbar con tapón de rosca y capacidad de 4 ml se colocaron 64 µl de cada una de las diluciones más 1 ml de buffer de fosfatos (0.2 M, pH 8.2) y 0.5 ml de TNBS al 0.01%. La mezcla fue agitada en vórtex durante 10 segundos y se colocó en baño de agua a 50°C durante 30 minutos bajo la oscuridad. La reacción fue frenada con la adición de 1 ml de sulfito de sodio 0.1 M. Las mezclas fueron enfriadas a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro (JENWAY 6305, UV/Vis., JENWAY, Ltd. Felsted, U.K). Se graficaron los datos de absorbancia obtenidos con respecto a la concentración de L-leucina correspondiente y se hizo el ajuste de los datos por regresión lineal simple.



Curva estándar de L-leucina

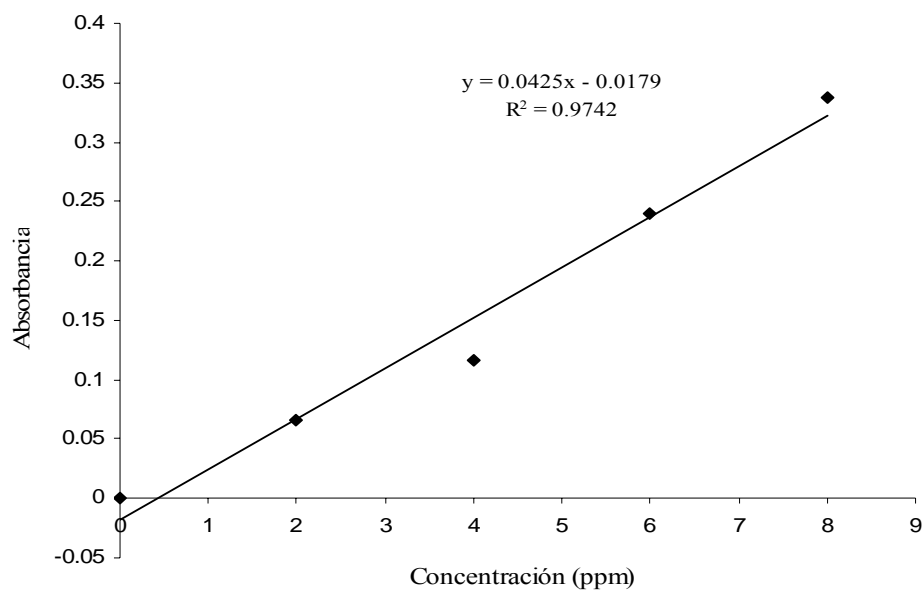
ANEXO 3

Curva estándar para determinación de proteína por el método de Bradford (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad USA).

A partir de una solución estándar de albúmina de suero bovino (BSA) de 10 µg/ml (ppm) se preparó la curva estándar como se describe a continuación.

Agua (µl)	BSA (µl)	BSA (µg)	Reactivo Bradford (µl)
800	0	0	200
600	200	2	200
400	400	4	200
200	600	6	200
0	800	8	200

Cada tubo con su contenido fue mezclado perfectamente en vórtex y se leyó la absorbancia de la mezcla a 595 nm.



Curva estándar para determinar proteína

ANEXO 4

Análisis sensorial de carne de codorniz

Nombre del juez _____ Fecha _____

Instrucciones: Pruebe cada una de las muestras y señale con una X la calificación según la intensidad del atributo. Se recomienda no consumir la muestra y enjuagarse la boca entre cada muestra que pruebe.

Muestra _____

Atributo	Calificación								
Color	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olor desagradable	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sabor desagradable	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Blandura	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Jugosidad	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Calidad total	1	2	3	4	5	6	7	8	9

Comentarios

ANEXO 5

Análisis estadístico para la selección del nivel de melaza en fermentaciones de mezcla de desechos de pescado.

Análisis de varianza para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	5	1.356842	0.2713683	32.15	0.000294
Dentro de grupos	6	0.05065	8.441667E-03		
Total	11	1.407492			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Nivel de melaza	Media	Grupo de Tukey-Kramer
6% Control	5.42	A
6% Con inóculo	4.94	B
12% Control	4.995	B
12% Con inóculo	4.46	C
18% Control	4.78	B
18% Con inóculo	4.44	C

A, B y C: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	5	0.1433	0.02866	61.41	0.000045
Dentro de grupos	6	0.0028	4.666667E-04		
Total	11	0.1461			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Nivel de melaza	Media	Grupo de Tukey-Kramer
18% Con inóculo	0.425	A
18% Control	0.255	B
12% Con inóculo	0.39	C
12% Control	0.205	B
6% Con inóculo	0.2	D
6% Control	0.115	E

A, B, C, D y E: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	5	3.932967	0.7865933	79.99	0.000021
Dentro de grupos	6	0.059	9.833333E-03		
Total	11	3.991967			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Nivel de melaza	Media	Grupo de Tukey-Kramer
6% Control	6.195	A
6% Con inóculo	5.335	B
12% Control	5.18	B
12% Con inóculo	4.655	C
18% Control	4.74	C
18 % inóculo	4.485	D

A, B, C y D: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	4	0.1729018	4.322544E-02	1111.25	0.000000
Dentro de grupos	5	1.9449E-04	3.889801E-05		
Total	9	0.1730963			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Nivel de melaza	Media	Grupo de Tukey-Kramer
18% Con inóculo	0.4960178	A
18% Control	0.3231771	C
12% Con inóculo	0.3768873	B
12% Control	0.1739229	D
6% Con inóculo	0.1396804	E

A, B, C, D y E: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para Aw de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	4	0.0002106	5.265E-05	47.86	0.000355
Dentro de grupos	5	0.0000055	0.0000011		
Total	9	0.0002161			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para Aw de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes niveles de melaza.

Nivel de melaza	Media	Grupo de Tukey-Kramer
6% Con inóculo	0.9715	A
12% Control	0.972	A
12% Con inóculo	0.9645	B
18% Control	0.9625	B
18% Con inóculo	0.961	B

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

ANEXO 6

Análisis estadístico para evaluar el efecto del tipo de desecho pesquero y reactor en fermentaciones de desechos de pescado.

Análisis de varianza para el pH de fermentaciones de desechos de pescado a 96 h* usando diferente tipo de reactor y fuente de desecho pesquero.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
A: Desecho pesquero	2	0.1421583	7.10796E-02	61.36	0.000000
B: Inóculo	1	0.2816667	0.281667	243.17	0.000000
AB	2	4.3584E-03	2.17917E-03	1.88	0.194680
C: Reactor	1	3.6817E-02	3.68167E-02	31.78	0.000109
AC	2	0.2874083	0.147042	124.06	0.000000
BC	1	0.05415	0.05415	46.75	0.000018
ABC	2	0.047275	0.0236375	20.41	0.000138
Dentro de grupos	12	0.0139	1.15833E-03		
Total	23	0.8677334			

* El ANDEVA se hizo a 96 h debido a que a ese tiempo se presentó la máxima acidificación.

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de desechos de pescado a 96 h* usando diferente tipo de reactor y fuente de desecho pesquero.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
A: Desecho pesquero	2	0.3410547	0.1705274	7.27	0.008563
B: Inóculo	1	3.451072	3.451072	147.03	0.000000
AB	2	0.3545473	0.1772737	7.55	0.007530
C: Reactor	1	1.65812E-02	1.6584E-02	0.71	0.417028
AC	2	1.111441	0.5557204	23.68	0.000068
BC	1	1.131973	1.131973	48.23	0.000016
ABC	2	0.5977949	0.2988974	12.73	0.001079
Dentro de grupos	12	0.2816666	2.3472E-02		
Total	23	7.286133			

* El ANDEVA se hizo a 96 h debido a que a ese tiempo se presentó la máxima acidificación.

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para pH de fermentaciones de desechos de pescado a 96 h usando diferente tipo de reactor y fuente de desecho pesquero.

Tipo de reactor	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Frasco	4.43	B
Lecho empacado	4.51	A
Fuente de desecho pesquero	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Desechos de barracuda	4.36	B
Mezcla de desechos	4.54	A
FAC	4.50	A
Inóculo	Media	Grupo de Tukey-Kramer
0%	4.58	A
5%	4.36	B

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de desechos de pescado a 96 h usando diferente tipo de reactor y fuente de desecho pesquero.

Tipo de reactor	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Frasco	0.3889	A
Lecho empacado	0.3931	A
Fuente de desecho pesquero	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Desechos de barracuda	0.3988	A
Mezcla de desechos	0.3915	A
FAC	0.3678	B
Inóculo	Media	Grupo de Tukey-Kramer
0%	0.3439	B
5%	0.4281	A

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para Aw de fermentaciones de desechos de pescado a 96 h* usando diferente tipo de reactor y fuente de desecho pesquero.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
A: Desecho pesquero	2	8.467E-04	4.23375E-04	108.10	0.000000
B: Inóculo	1	0.000015	0.0000015	0.38	0.547582
AB	2	9.25E-06	4.625E-06	1.18	0.340292
C: Reactor	1	0.00096	0.000096	24.51	0.000336
AC	2	2.325E-05	1.1625E-05	2.97	0.089683
BC	1	1.06667E-05	1.06667E-05	2.72	0.124797
ABC	2	8.6083E-05	4.30467E-05	10.99	0.001940
Dentro de grupos	12	0.000047	3.91667E-06		
Total	23	0.001205			

* El ANDEVA se hizo a 96 h debido a que a ese tiempo se presentó la máxima acidificación.

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para A_w de fermentaciones de desechos de pescado a 96 h usando diferente tipo de reactor y fuente de desecho pesquero.

Tipo de reactor	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Frasco	0.95575	A
Lecho empacado	0.95975	B
Fuente de desecho pesquero	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Mezcla de desechos	0.9625	A
FAC	0.961375	A
Desechos de barracuda	0.949375	B
Inóculo	Media	Grupo de Tukey-Kramer
0%	0.958	A
5%	0.9575	A

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

ANEXO 7

Análisis estadístico para la selección del iniciador en fermentaciones de mezcla de desechos de pescado.

Análisis de varianza para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	0.1084	0.0542	4.12	0.137828
Dentro de grupos	3	0.03945	0.01315		
Total	5	0.140795			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	4.72	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4.44	A
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	4.43	A

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	0.0344636	0.0172318	61.93	0.003637
Dentro de grupos	3	8.34846E-04	2.78268E-04		
Total	5	0.0352984			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 48 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	0.3179611	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.4210534	B
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	0.5032109	C

A, B y C: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	0.0787	0.03935	81.41	0.137828
Dentro de grupos	3	0.00145	4.83333E-04		
Total	5	0.08015			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	4.64	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4.485	B
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	4.36	C

A, B y C: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	3.433546E-02	1.7677E-02	690.20	0.000101
Dentro de grupos	3	7.462077E-05	2.4879E-05		
Total	5	3.441008E-02			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 96 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	0.3844598	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.4960178	B
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	0.5683704	C

A, B y C: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 144 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	5.543344E-02	2.77672E-02	75.62	0.002712
Dentro de grupos	3	1.099519E-03	3.66562E-04		
Total	5	5.653296E-02			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 144 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	0.3219801	B
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.5055093	A
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	0.5414665	A

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 192 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	0.1714333	8.571666E-02	66.79	0.003255
Dentro de grupos	3	0.00385	1.283333E-03		
Total	5	0.1752833			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 192 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	4.77	A
<i>Lactobacillus plantarum</i>	4.515	B
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	4.36	C

A, B y C: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 192 h utilizando diferentes iniciadores.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	2	4.79505E-02	2.39753E-02	60.30	0.003782
Dentro de grupos	3	1.19293E-03	3.97631E-04		
Total	5	4.91455E-02			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado a 192 h utilizando diferentes iniciadores.

Iniciador	Media	Grupo de Tukey-Kramer
Control	0.3164306	B
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.489797	A
<i>Lactobacillus</i> sp. B2	0.518963	A

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

ANEXO 8

Análisis estadístico para grado de hidrólisis de proteínas de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizada en reactor (microsililo) de lecho empacado.

Análisis de varianza para grado de hidrólisis de proteínas de fermentaciones realizadas en microsilos de lecho empacado.

Análisis a 2 días de fermentación					
Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medio	Razón F	Significancia
Entre grupos	1	192.0235	192.0235	19.87	0.011185
Dentro de grupos	4	38.66391	9.665977		
Total	5	230.6875			
Análisis a 4 días de fermentación					
Entre grupos	1	396.3286	396.3286	43.74	0.002710
Dentro de grupos	4	36.24251	9.060627		
Total	5	432.5711			
Análisis a 15 días de fermentación					
Entre grupos	1	165.5649	165.5649	24.55	0.007735
Dentro de grupos	4	26.97709	6.744271		
Total	5	192.5419			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el grado de hidrólisis de proteínas de fermentaciones realizadas en microsilos de lecho empacado.

Análisis a 2 días de fermentación		
Condición	Media	Grupo de Tukey-Kramer
(con inóculo) <i>Lactobacillus</i> sp. B2	36.75583	A
Control (sin inóculo)	25.44142	B
Análisis a 4 días de fermentación		
(con inóculo) <i>Lactobacillus</i> sp. B2	65.59361	A
Control (sin inóculo)	49.33879	B

A y B: Medias con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

ANEXO 9

Análisis estadístico para los datos de pH y ATT de licores de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Análisis de varianza para el pH de licores de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Tiempo (días)	Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
5	Entre grupos	2	1.3433E-02	6.7166E-03	80.60	0.002470
	Dentro de grupos	3	0.0025	8.3333E-05		
	Total	5	1.3683E-02			
10	Entre grupos	2	6.533334E-03	3.2666E-03	65.33	0.003362
	Dentro de grupos	3	0.00015	0.00005		
	Total	5	6.683333E-03			
20	Entre grupos	2	0.0324	0.0162	324.00	0.000313
	Dentro de grupos	3	0.00015	0.00005		
	Total	5	0.03255			
30	Entre grupos	2	0.1161333	5.8067E-02	1161.33	0.000046
	Dentro de grupos	3	0.00015	0.00005		
	Total	5	0.1162833			
40	Entre grupos	2	0.1153	0.05765	345.90	0.000284
	Dentro de grupos	3	0.0005	1.66667E-04		
	Total	5	0.1158			
120	Entre grupos	2	1.703333E-02	8.5166E-03	85.17	0.002277
	Dentro de grupos	3	0.0003	0.0001		
	Total	5	1.733333E-02			
165	Entre grupos	2	8.003333E-02	4.0017E-02	7.12	0.0725310
	Dentro de grupos	3	0.01685	5.6167E-03		
	Total	5	9.688333E-02			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH de licores de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Tiempo (días)	Reactor	Media	Grupo de Tukey-Kramer
5	A	4.21	c
	B	4.28	b
	C	4.32	a
10	A	4.30	c
	B	4.33	b
	C	4.38	a
20	A	4.44	c
	B	4.62	a
	C	4.53	b
30	A	4.6	b
	B	4.9	a
	C	4.89	a
40	A	4.76	b
	B	5.07	a
	C	5.04	a
120	A	4.98	b
	B	5.11	a
	C	5.01	b
165	A	5.145	a
	B	5.32	a
	C	5.04	a

a, b y c: Medias a cada tiempo con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

Análisis de varianza para ATT de licores de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Tiempo (días)	Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
5	Entre grupos	2	3.97889E-03	1.989449E-03	83.57	0.002341
	Dentro de grupos	3	7.14337E-05	2.380446E-05		
	Total	5	4.05311E-03			
10	Entre grupos	2	1.7797E-03	8.898599E-04	123.93	0.001308
	Dentro de grupos	3	2.15409E-05	7.180098E-06		
	Total	5	1.80126E-03			
20	Entre grupos	2	7.78184E-03	3.890917E-03	96.52	0.001893
	Dentro de grupos	3	1.20934E-04	4.031046E-05		
	Total	5	7.90276E-03			
30	Entre grupos	2	7.29649E-03	3.648074E-03	221.86	0.000550
	Dentro de grupos	3	4.93297E-05	1.644323E-05		
	Total	5	7.34479E-03			
40	Entre grupos	2	0.01038895	5.194448E-03	264.04	0.000425
	Dentro de grupos	3	901809E-05	1.96727E-05		
	Total	5	1.04479E-02			
120	Entre grupos	2	1.70137E-03	8.506854E-04	20.90	0.017329
	Dentro de grupos	3	1.22187E-04	4.070291E-05		
	Total	5	1.82348E-03			
165	Entre grupos	2	9.19357E-03	4.596759E-03	11.07	0.041243
	Dentro de grupos	3	1.24622E-03	4.154041E-04		
	Total	5	1.04397E-02			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para ATT de licores de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Tiempo (días)	Reactor	Media	Grupo de Tukey-Kramer
5	A	0.48	a
	B	0.43	b
	C	0.42	b
10	A	0.49	a
	B	0.46	b
	C	0.45	b
20	A	0.45	a
	B	0.36	c
	C	0.41	b
30	A	0.34	a
	B	0.26	c
	C	0.27	b
40	A	0.36	a
	B	0.28	b
	C	0.27	b
120	A	0.22	b
	B	0.21	b
	C	0.25	a
165	A	0.20	b
	B	0.17	b
	C	0.27	a

a, b y c: Medias a cada tiempo con distinta letra difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

ANEXO 10

Análisis estadístico para los datos de pH, ATT, azúcares solubles totales, A_w y cuenta total de BAL de la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Análisis de varianza para los datos de pH y ATT de la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Variable	Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
pH	Entre grupos	6	0.9431714	0.157195	815.09	0.000000
	Dentro de grupos	7	0.00135	1.9287E-04		
	Total	13	0.9445214			
ATT	Entre grupos	6	6.89713E-2	1.1495E-02	67.28	0.000008
	Dentro de grupos	7	1.19591E-03	1.7085E-04		
	Total	13	7.016731E-02			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para el pH y ATT de la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Reactor y tiempo (días)	pH	Grupo de Tukey-Kramer	ATT (mmol/g)	Grupo de Tukey-Kramer
A (150)	4.8	c	0.46	b
B (150)	5.01	b	0.39	c
C (150)	4.95	b	0.38	c
A (165)	5.16	a	0.35	d
B (165)	5.23	a	0.32	e
C (165)	5.34	a	0.31	e
A* (7)	4.52	d	0.51	a

a, b, c y d: Valores con distinta letra en cada columna difieren estadísticamente ($P < 0.05$).
A* (7) = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.

Análisis de varianza para los datos de azúcares solubles totales, Aw y cuenta total de BAL en la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Variable	Fuente	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Azúcares	Entre grupos	6	1074.87	179.1459	1449.42	0.000000
	Dentro de grupos	7	0.865905	0.1235986		
	Total	13	51075.741			
Aw	Entre grupos	6	7.34872E-4	1.22476E-04	43.97	0.000033
	Dentro de grupos	7	0.000195	2.78574E-06		
	Total	13	7.5457E-04			
Cuenta total de BAL	Entre grupos	6	8.8885E+19	1.48057E+19	105.75	0.000002
	Dentro de grupos	7	9.8008E+17	1.40001E+17		
	Total	13	8.9885E+19			

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para los datos de azúcares, Aw y cuenta total de BAL en la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas en reactores de columna.

Reactor y tiempo (días)	Azúcares	Grupo de Tukey-Kramer	Aw	Grupo de Tukey-Kramer	Cuenta total de BAL	Grupo de Tukey-Kramer
A (150)	6.725883	b	0.9595	b	2200000	b
B (150)	5.12	d	0.9555	c	495000	b
C (150)	4.949412	d	0.962	b	1275000	b
A (165)	4.843529	d	0.9495	d	1025000	b
B (165)	5.778823	c	0.943	d	1360000	b
C (165)	4.655294	d	0.947	d	2330000	b
A* (7)	30.315	a	0.963	a	7.2 X10 ⁹	a

a, b, c y d: Valores con distinta letra en cada columna difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

A* (7) = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.

ANEXO 11

Análisis estadístico para los datos de composición química proximal de la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Análisis de varianza para los datos de humedad, cenizas, proteína, lípidos y fibra cruda de la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Componente	Fuente de variación	G. L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Humedad	Entre grupos	6	758.4683	126.4114	276.97	0.000000
	Dentro de grupos	14	6.38966776	0.4564048		
	Total	20	4.8579			
Cenizas	Entre grupos	6	29.228452	4.871408	2.71	0.058543
	Dentro de grupos	14	5.202055	1.800146		
	Total	20	4.43049			
Proteína	Entre grupos	6	15.90154	2.650256	7.66	0.008371
	Dentro de grupos	7	2.422128	0.3460183		
	Total	13	18.32366			
Lípidos	Entre grupos	6	495.2062	82.53437	157.14	0.000000
	Dentro de grupos	7	3.6767	0.5252429		
	Total	13	498.8829			
Fibra cruda	Entre grupos	6	0.1157714	1.92954E-02	1.39	0.336798
	Dentro de grupos	7	0.0974	1.39149E-02		
	Total	13	0.2131714			

G. L. = Grados de libertad.

ANEXO 12

Análisis estadístico para los datos de grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de proteína de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Análisis de varianza para los datos de grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de proteínas de la fracción sólida de fermentaciones realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Variable	Fuente	G. L.	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Razón F	Significancia
Grado de Hidrólisis de proteína	Entre grupos	6	106.9739	17.82899	3.56	0.023535
	Dentro de grupos	14	70.096	5.006857		
	Total	20	177.0699			
Digestibilidad de proteína	Entre grupos	6	124.9707	20.82845	12.93	0.001767
	Dentro de grupos	7	11.27536	1.610766		
	Total	13	136.2461			

G. L. = Grados de libertad.

Comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer para grado de hidrólisis y digestibilidad *in vitro* de proteínas de la fracción sólida de fermentaciones de mezcla de desechos de pescado realizadas a nivel piloto en reactores de columna.

Reactor y tiempo (días)	Grado de Hidrólisis (%) Media	Grupo de Tukey-Kramer	Digestibilidad de proteína (%) Media	Grupo de Tukey-Kramer
A (150)	89.22	a	84.15	a
B (150)	85.07	b	78.46	c
C (150)	86.76	b	81.61	a
A (165)	87.27	a	79.72	b
B (165)	81.99	b	77.02	c
C (165)	84.88	b	77.79	c
A* (7)	88.29	a	85.37	a

a, b y c: Medias con distinta letra en cada columna difieren estadísticamente ($P < 0.05$).

A* (7) = Repetición de reactor A (reactor chico, L/D=2) a 7 días de fermentación.⁴⁹

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados que presentó:

M.C. JOSÉ CARMEN RAMÍREZ RAMÍREZ.

El día 13 de Febrero de 2009

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.



H. Jurado

Presidente: Dr. José Luis Arredondo Figueroa, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Hidrobiología, Planta de producción acuícola.

Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Planta piloto de fermentación en medio sólido.

Sinodales: Dra. Arely Prado Barragán, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Planta piloto de fermentación en medio sólido.

Dra. Ruth Pedroza Islas. Universidad Iberoamericana, Departamento de Ingeniería y Ciencias Químicas.

