

**ESTUDIO DEL PROCESO DE ENSILAJE DE VÍSCERAS DE CACHAMA
BLANCA (*Piaractus brachypomus*) UTILIZANDO EL MÉTODO QUÍMICO Y EL
BIOLÓGICO CON MELAZA Y SUERO LÁCTEO COMO SUSTRATO**

Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Ingeniería de la
Universidad de Antioquia

Director

JOSÉ EDGAR ZAPATA MONTOYA



SERGIO ANDRÉS VÁSQUEZ ZULUAGA

FACULTAD DE INGENIERÍA

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

2015

AGRADECIMIENTOS

Primero agradezco a DIOS, por darme vida, fuerza y salud para llevar a cabo este trabajo. También agradezco a mi familia, especialmente a mi madre porque siempre ha sido el timón que dirige nuestro hogar. Al grupo Nutrición y tecnología de alimentos y al Dr. José Edgar Zapata por el apoyo académico y por darme la oportunidad de realizar el trabajo en el laboratorio.

A mis compañeros del grupo de investigación por su colaboración, por su amistad y por tantos buenos momentos compartidos.

Por ultimo agradezco a la Dra. Gelmy Ciro y a la profesora Nelly Ospina de la facultad de la facultad Química Farmacéutica de la Universidad de Antioquia por su valiosa amistad y por contribuir con mi formación académica.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| 1. RESUMEN..... | 8 |
| 2. INTRODUCCION..... | 10 |
| 3. OBJETIVOS | 13 |
| 3.1 Objetivo general..... | 13 |
| 3.2 Objetivos específicos | 13 |
| 4. MARCO TEÓRICO..... | 14 |
| 4.1 Cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) | 14 |
| 4.1.1 Características morfológicas de la cachama blanca..... | 14 |
| 4.1.2 Vísceras de pescado..... | 15 |
| 4.2 Ensilaje de pescado | 16 |
| 4.2.1 Ensilaje químico..... | 17 |
| 4.2.2 Ensilaje biológico de pescado | 19 |
| 4.3 Cinética de crecimiento microbiano..... | 22 |
| 4.3.1 Modelo de Monod..... | 24 |
| 4.3.2 Modelo de Moser | 24 |
| 4.3.3 Modelo de Contois y Fujimoto | 25 |
| 4.3.4 Modelo logístico | 25 |
| 4.4 Diseño experimental superficie de respuesta | 26 |
| 4.5 Secado solar como método de deshidratación..... | 27 |
| 4.5.1 Determinación experimental de la velocidad de secado..... | 30 |
| 5. esTADO DEL ARTE | 34 |
| 6. MATERIALES Y METODOS | 37 |
| 6.1 Obtención de vísceras de cachama blanca | 37 |
| 6.2 Estandarización ensilaje químico..... | 37 |
| 6.2.1 Diseño experimental en el ensilaje químico | 39 |
| 6.2.2 Análisis proximal..... | 40 |
| 6.2.3 Determinaciones microbiológicas | 41 |
| 6.3 Ensilaje biológico | 42 |
| 6.3.1 Selección de las cepas | 42 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.3.2 | Activación de cepas | 42 |
| 6.3.3 | Cinética microbiana..... | 43 |
| 6.3.4 | Consumo de azúcares..... | 43 |
| 6.3.5 | Recuento de bacterias ácido lácticas..... | 44 |
| 6.3.6 | Determinación de acidez titulable total como ácido láctico..... | 44 |
| 6.3.7 | Calculo de parámetros productivos | 44 |
| 6.3.8 | Diseño experimental ensilaje biológico | 45 |
| 6.3.9 | Análisis proximal..... | 46 |
| 6.3.10 | Determinaciones microbiológicas | 46 |
| 6.4 | Secado solar | 47 |
| 6.4.1 | Fabricación del secador solar..... | 47 |
| 6.4.2 | Construcción del secador solar | 48 |
| 6.4.3 | Ensayos de secado solar | 48 |
| 6.4.4 | Análisis de bases nitrogenadas volátiles totales NBVT..... | 49 |
| 7. | RESULTADOS Y DISCUSION..... | 50 |
| 7.1 | Caracterización fisicoquímica de las vísceras de cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>) | 50 |
| 7.2 | Estandarización del ensilaje químico | 51 |
| 7.2.1 | Diseño experimental ensilaje químico..... | 51 |
| 7.3 | Estandarización ensilaje biológico..... | 57 |
| 7.3.1 | Selección de las cepas..... | 57 |
| 7.3.2 | Elaboración ensilaje biológico | 60 |
| 7.3.3 | Cinética microbiana <i>L. plantarum</i> en ensilaje biológico óptimo | 67 |
| 7.4 | Escalamiento ensilado ácido de vísceras de cachama blanca a escala de 7 kg. 73 | |
| 7.5 | Secado solar del escaldo ensilado químico | 74 |
| 8. | CONCLUSIONES..... | 89 |
| 9. | perspectivas futuras | 90 |
| 10. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>)..... | 14 |
| Figura 2. Anatomía interna de un pez | 16 |
| Figura 3. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana | 22 |
| Figura 4. Secador solar indirecto..... | 28 |
| Figura 5. Secador solar directo | 29 |
| Figura 6. Curva típica de velocidad de secado constante | 31 |
| Figura 7. Curva velocidad de secado en función de la humedad libre del producto | 32 |
| Figura 8. Diagrama elaboración ensilaje químico..... | 38 |
| Figura 9. Vísceras de Cachama blanca (<i>Piaractus brachypomus</i>)..... | 50 |
| Figura 10. Superficie de respuesta para recuento de mohos y levaduras (UFC/g) (A), Mesófilos aerobios (UFC/g)..... | 55 |
| Figura 11. Superficie de respuesta para recuento de coliformes totales NMP/g (C) y <i>E. coli</i> NMP /g (D), en ensilado ácido en función del % de ácido sulfúrico y el % de ácido fórmico | 56 |
| Figura 12. Curva de crecimiento de <i>L. plantarum</i> vs absorbancia en medio líquido MRS. | 61 |
| Figura 13. Superficie de respuesta para % de ácido láctico en ensilado biológico de pescado en función del % de melaza y el % de inóculo (A), y del % de lactosuero y el % de inóculo (B) | 65 |
| Figura 14. Superficie de respuesta para recuento de hongos UFC/g, en ensilado biológico de pescado, en función del % de melaza y el % de inóculo (A), y del % de lactosuero y el % de inóculo (B). | 66 |
| Figura 15. Curva de correlación de peso seco g/L con UFC/g para el microorganismo <i>L. plantarum</i> en medio MRS | 68 |
| Figura 16. Cinética del comportamiento del <i>Lactobacillus plantarum</i> en el ensilaje biológico de pescado optimizado (A) concentración de biomasa y de sustrato versus el tiempo. (B) concentración de biomasa y de producto versus el tiempo. | 69 |
| Figura 17. Cinética de biomasa ajustada al modelo logístico..... | 71 |
| Figura 18. Ensilaje ácido óptimo de vísceras de Cachama blanca | 73 |
| Figura 19. Mezcla de ensilaje ácido óptimo de vísceras de Cachama blanca con 30% de harina de trigo | 75 |
| Figura 20. Construcción del secador solar | 76 |
| Figura 21. Secado solar de la base proteica elaborada a partir de una mezcla de ensilaje ácido con harina de trigo | 77 |
| Figura 22. Perfiles de temperatura del secador y del ambiente | 78 |

| | |
|---|----|
| Figura 23. Comportamiento de la temperatura y %HR en relación al interior del secador | 80 |
| Figura 24. Cinética de secado de la base proteica..... | 81 |
| Figura 25. Curva de velocidad de secado versus humedad libre de la base proteica | 82 |
| Figura 26. Comportamiento de la temperatura dentro del secador para el secado 1 y el secado 2. | 83 |
| Figura 27. Cinética del secado 1 y secado 2 para la base proteica. | 84 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Diseño central compuesto del ensilaje ácido de vísceras de cachama blanca. ... | 40 |
| Tabla 2. Diseño central compuesto del ensilaje biológico de vísceras de cachama blanca | 46 |
| Tabla 3. Composición fisicoquímica de vísceras de Cachama blanca en base humedad y en base seca | 51 |
| Tabla 4. Diseño central compuesto para ensilaje químico | 52 |
| Tabla 5. Análisis de varianza (valor P) del diseño central compuesto..... | 53 |
| Tabla 6. Valores óptimos predichos y experimentales en la optimización del porcentaje de ácido sulfúrico y ácido fórmico | 57 |
| Tabla 7. Evaluación de rendimiento para las cepas <i>L. plantarum</i> y cultivo liofilizado de yogurt YBA 986..... | 59 |
| Tabla 8. Diseño central compuesto para ensilaje biológico..... | 62 |
| Tabla 9. Análisis de varianza ANOVA (valor P) del diseño central compuesto ensilaje biológico..... | 63 |
| Tabla 10. Valores óptimos predichos y experimentales en la optimización del porcentaje de inóculo, melaza y suero lácteo..... | 67 |
| Tabla 11. Formulación ensilaje biológico óptimo | 68 |
| Tabla 12. Parámetros productivos en la fermentación del ensilaje biológico óptimo | 71 |
| Tabla 13. Recuento microorganismos ensilaje químico óptimo..... | 74 |
| Tabla 14. Composición fisicoquímica de la base proteica después del proceso de secado | 85 |
| Tabla 15. Composición microbiológica de la base proteica después del proceso de secado..... | 86 |

1. RESUMEN

En los últimos tiempos ha cobrado interés la utilización de subproductos agroindustriales para suplementar las dietas de algunos animales, ya que la alimentación es uno de los rubros de mayor incidencia en el costo de producción. Es por esta razón que en esta investigación se buscó el uso de éstos subproductos piscícolas específicamente las vísceras de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) para obtener una base proteica que sirva como materia prima en la elaboración de dietas de algunos animales.

En este trabajo se desarrollaron las metodologías de ensilaje químico y ensilaje biológico para la producción de ensilaje de vísceras de pescado

En la estandarización del proceso de ensilaje químico, se aplicó la metodología de superficie de respuesta para estudiar el efecto del ácido fórmico (0 – 2% p/p), el ácido sulfúrico (0 – 2% p/p) y sus mezclas sobre los parámetros microbiológicos: mesófilos aerobios (UFC/g), mohos y levaduras (UFC/g), coliformes totales (NMP/g) y *E. coli* (NMP/g). Los resultados del diseño de experimentos (DOE) mostraron que las condiciones óptimas para minimizar el recuento microbiano se obtiene con la mezcla de 2% de ácido fórmico y 1% de ácido sulfúrico. Lo cual representa un avance en este campo, porque en la literatura se presenta comúnmente el uso de 2 % de ácido sulfúrico, con lo que se racionaliza el uso de este compuesto, reduciendo la necesidad de su neutralización y el efecto adverso que tiene sobre algunos compuestos biológicos.

En la elaboración de ensilaje biológico se estudió el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 y cultivo liofilizado de yogurt comercial YBA 986, en donde se seleccionó *L. plantarum* ya que arrojó mejores resultados en cuanto a rendimiento biomasa/sustrato (0,050) y producto/sustrato (0,474). Posteriormente con el microorganismo *Lactobacillus plantarum* se evaluaron las condiciones de operación (concentración de melaza y/o suero lácteo, y concentración de inóculo) sobre la producción de ácido láctico y recuentos microbianos de mohos y levaduras,

coliformes totales y fecales, los resultados de este diseño mostraron que las condiciones óptimas para aumentar la producción de ácido láctico y minimizar el recuento de hongos y levaduras se obtiene con una mezcla de 3.01 % de inóculo, 11.69 de melaza y 0.38 de lactosuero.

Se utilizó las condiciones óptimas del ensilado biológico para determinar la cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y generación de producto en este ensilaje.

Por último se utilizaron las condiciones óptimas del ensilado químico para realizar un escalado del proceso en baldes de 7 kg, el cual fue mezclado con harina de trigo para elaborar una base proteica, la cual fue sometida a secado solar por 8 horas lográndose un porcentaje de humedad de 11.61% y una temperatura máxima alcanzada por el secador de 69.7°C.

2. INTRODUCCION

A nivel mundial, cada año se generan cerca de 100 millones de toneladas de pescado de las cuales más del 50% son descartados como desecho o subproductos tales como: huesos, piel, cabezas y vísceras, la mayor parte de estos subproductos está siendo utilizada en la producción de harina de pescado la cual tiene un costo elevado en el mercado (Je *et al.*, 2007).

En el caso de Colombia la acuicultura ha crecido en promedio el 13 % anual durante los últimos 27 años, este crecimiento es comparable con el que se presenta a nivel mundial; donde se han destacado principalmente la pequeña y mediana acuicultura (Merino *et al.*, 2013). Esto conlleva a que la producción pesquera tradicional de extracción y captura sea reemplazada por la crianza de peces en estanques, al punto que en el año 2011 representó el 51,4 % de la producción pesquera total. Es allí donde Colombia se posiciona en el sexto país en orden de importancia de la acuicultura en América Latina (Merino *et al.*, 2013).

En nuestro país según los datos de la encuesta nacional agropecuaria 2010 la tilapia roja es la que más aporta en cuanto al volumen de producción con el 62%, seguida por la cachama blanca con el 16%, la tilapia plateada aporta el 14%, la trucha el 5% y el 3% las otras especies restantes. Los principales departamentos en orden de producción son: Huila con 47.65%, Meta con el 16,19%, Tolima con el 7.05%, Antioquia 6.09% y por el último el Valle del Cauca con el 3.89 %. En el caso de Antioquia la producción total de peces provenientes de la piscicultura fue 3.849 toneladas de los cuales 2.103 fueron de tilapia roja, 1.093 de trucha y 570 de Cachama (DANE, 2010).

Teniendo en cuenta la producción de peces en Colombia y especialmente la generación de vísceras (entre el 5 y el 11 % del peso corporal) (Martinez, 2003), se ha encontrado la necesidad de buscar un uso para el aprovechamiento de éstos

subproductos piscícolas, debido al gran impacto ambiental, principalmente por la contaminación de suelos y ríos, el enturbiamiento del agua y la modificación del ecosistema acuático que ocasionan problemas de olores y altos contenidos en materia orgánica que sirven de nutrientes para el crecimiento de bacterias y parásitos, ocasionando enfermedades en los peces y otros organismos que viven en los ecosistemas acuáticos (Obregón, 2006). Por otro lado, se ha encontrado que estos residuos pesqueros son fuentes importantes de proteínas, lípidos y minerales, con alto valor nutricional (Jeon *et al.*, 1999), motivo por el cual se han estado realizando investigaciones relacionadas con la búsqueda de alternativas de solución para la utilización de subproductos piscícolas, que permitan disminuir el riesgo ambiental que generan. Además, de brindar un mejor aprovechamiento de estos residuos (Martinez, 2003). Una de estas alternativas es el método llamado ensilaje de vísceras de pescado, el cual es utilizado como un método de conservación de subproductos originados de la piscicultura, éste consiste en darle estabilidad a dichos subproductos mediante la adición de ácidos orgánicos, inorgánicos, sal y mezcla de ácidos (Bermudez *et al.*, 1999). El proceso de ensilaje de pescado también se puede dar por fermentación bacteriana utilizando una fuente de carbohidratos como puede ser la panela o la miel de caña (Spanopoulos *et al.*, 2010).

Se ha trabajado mucho en el tema de ensilaje con subproductos provenientes de pescado, sin embargo el ensilaje de vísceras de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) ha sido poco estudiado (Bermudez *et al.*, 1999), es por esto que en este proyecto se pretende evaluar la producción de ensilado de vísceras de cachama blanca producida en el municipio de San Carlos (Antioquia) mediante la utilización de ensilaje químico con ácido sulfúrico y ácido fórmico y de ensilaje biológico utilizando 2 cepas ácido lácticos y melaza y suero lácteo como sustrato. De este modo se pretende optimizar tanto el ensilaje químico como biológico, reduciendo los costos por concepto de insumos y garantizando su calidad

microbiológica. Para de esta manera aportar a la disminución de la contaminación ocasionada por dichos subproductos (Belli, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el proceso de ensilaje de vísceras de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) utilizando el método químico y el biológico, para la obtención de una materia prima con potencial uso en la alimentación animal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar el efecto de las condiciones de operación (concentración de melaza y/o suero lácteo, y concentración de inóculo) sobre la producción de ácido láctico y el recuento microbiano en el ensilaje biológico de vísceras de cachama blanca, a escala de laboratorio.
- Determinar la cinética de crecimiento de biomasa, consumo de sustrato y generación de producto en el ensilaje biológico de vísceras de cachama blanca, a escala de laboratorio.
- Optimizar el proceso de ensilaje ácido de vísceras de cachama blanca, utilizando ácido sulfúrico, ácido fórmico y sus mezclas.
- Obtener una base proteica por medio de secado solar de ensilado de vísceras de cachama blanca a una escala de 7 Kg.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

4.1.1 Características morfológicas de la cachama blanca

La Cachama Blanca (*Piaractus brachypomus*) (ver figura 1), es un pez de escama, nativo de los Llanos Orientales, que gracias a sus hábitos alimenticios omnívoros, rápido crecimiento, alta calidad y adecuada aceptación comercial de su carne, es una especie ampliamente cultivada (Navarro, 2004).



Figura 1. Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

Fuente: (Virola, 2008)

La cachama blanca pertenece a la Familia Characidae, de la Subfamilia Serrasalminae, la cual junto con la cachama negra (*Colossoma macropomum*) comparten igual número de cromosomas ($2n=54$). Esta posee alto número de espinas, que se distribuyen como una malla en el interior de su musculatura (Trubey *et al.*, 2006).

Esta especie es considerada como la de mayor potencial en piscicultura en aguas cálidas continentales de América Latina, debido a su resistencia, manejo y fácil adaptación al consumo de alimentos concentrados y alimentos naturales en

condiciones de cautiverio. Esta también tiene un rápido crecimiento, con excelentes conversiones alimenticias y gran demanda en el mercado (García *et al.*, 2009). Desde el punto de vista de la acuicultura, la Cachama blanca ha sido exitosamente utilizada como especie de cultivo al igual que el híbrido obtenido de su cruce con la Cachama negra, *Colossoma macropomum*, conocido como cachamoto (González *et al.*, 2007).

La *Piaractus brachypomus* posee diversas ventajas entre las cuales se encuentra su aspecto corporal (color plateado con aletas rojizas) estas se ajustan a los gustos y preferencias de los consumidores en las áreas urbanas, esta especie también presenta una menor dimensión de cabeza y es fácil de escamar. La Cachama blanca puede ser producida en altitudes de hasta 1400 msnm (Mora, 2005), se puede sembrar a una densidad máxima de 4 peces/m², cuando se tiene entrada constante de agua para obtener al final de 6 meses animales de 500 gramos. Otro aspecto importante es que esta especie también soporta altas salinidades por lo cual su explotación se podría dar en diferentes ambientes (Novoa, 2002).

4.1.2 Vísceras de pescado

Para la obtención de las vísceras de Cachama blanca se debe realizar un corte de la región ventral, desde la cola hasta la cabeza, esto se debe hacer con cuidado de no romper la vesícula biliar, posteriormente se pueden extraer las vísceras manualmente las cuales están conformadas por intestino anterior y superior, estómago, hígado, corazón y la vejiga natatoria (FAO, 2010).

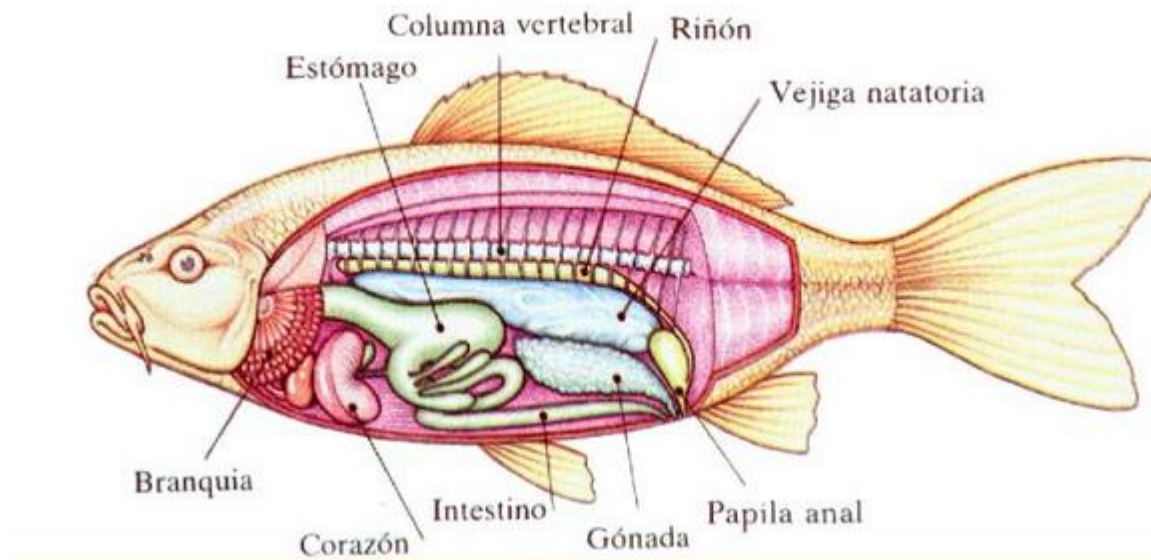


Figura 2. Anatomía interna de un pez
Fuente: (Valencia, 2010)

Cuando se habla de las vísceras de pescado de agua dulce se tiene que estas constituyen entre el 5 y 11% del peso corporal. Su composición química promedio es 67% agua, 10% proteína, 14% extracto etéreo y 3% minerales (Ahmed *et al.*, 1996).

También es importante resaltar que las vísceras de pescado una fuente potencial de enzimas, tales como proteasas que pueden tener algunas propiedades únicas para aplicaciones industriales (Klomklao *et al.*, 2011).

El porcentaje de vísceras en un pez también depende de su peso, es así como en la Cachama de pesos comerciales entre 1,2 y 1,5 kg se tiene un porcentaje de vísceras de 16,2 y 19,1 respectivamente (Mora, 2005).

4.2 Ensilaje de pescado

En ensilaje es un proceso de conservación de alimentos con alto contenido de humedad (65-70%) este se da en ausencia de luz, aire y humedad exterior, en este

proceso se produce una acidificación que da como resultado la inhibición de la actividad microbiana indeseable como coliformes, hongos y levaduras (Belli, 2009).

En este proceso se mezclan residuos de pescado tales como cabezas, colas, espinas y vísceras, todos estos previamente molidos y se agrega una fuente de carbono y microorganismos ácido lácticos (ensilaje biológico), o ácidos orgánicos e inorgánicos (ensilaje químico), para finalmente obtener un producto con alto valor proteico, alta humedad y una vida útil prolongada (Miranda *et al.*, 2010).

Cuando no se realiza una adecuada conservación de los residuos pesqueros puede ocurrir una proteólisis indeseable, resultando en la producción de nitrógeno amoniacal y las aminas cadaverina y putrescina, las cuales emiten un olor desagradable (Díaz , 2004). Estas aminas biógenas reflejan el estado de frescura de la materia, es por esto que es un punto a tener en cuenta en el control de calidad en alimentos como la harina de pescado (Galleguillos, 2011). También es importante resaltar que estas aminas son compuestos tóxicos los cuales pueden ocasionar daños en el hígado y disminuyen el rendimiento de los animales como el ganado, en seres humanos pueden ocasionar problemas cutáneos y gastrointestinales (Tapia, 2000).

El ensilado de pescado es un alimento con alta digestibilidad en comparación con los alimentos peletizados, también cabe resaltar que las proteínas que los constituyen son de alto valor biológico (Balsinde *et al.*, 2003).

4.2.1 Ensilaje químico

El ensilado químico de pescado es un proceso de conservación el cual consiste en adicionar ácidos minerales y/o orgánicos al pescado; entre los ácidos utilizados se encuentran el ácido fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico o mezclas de estos como por ejemplo acético y fórmico, fórmico y sulfúrico y propiónico y sulfúrico (Figuroa, 1997).

En ensilado químico de pescado es un producto pastoso semilíquido, el cual puede ser obtenido de pescado entero o partes del mismo, en este intervienen las enzimas proteolíticas propias del pescado que al adicionar los ácidos aumentan su actividad, esta adición de ácidos también logra que el producto final sea estable incluso a temperatura ambiente (Fernandez *et al.*, 2013).

Durante el tiempo que se encuentra en ensilaje almacenado las enzimas que se encuentran en el músculo hidrolizan las proteínas, la acción de estas enzimas se ve favorecida por los pH bajos encontrados en estos ensilajes (Borghesi *et al.*, 2008), es entonces cuando el nitrógeno presente en ellas se vuelve más soluble. Las proteínas se hidrolizan a péptidos de cadena larga y corta y aminoácidos libres, y la fuente de aminoácidos se vuelve más biodisponible (Vidotti *et al.*, 2003). Algunos reportes de literatura ponen en evidencia que muchos péptidos obtenidos de hidrolisis de proteínas están siendo empleados en mejorar funciones biológicas y son capaces de ejercer efectos específicos tales como: antimicrobiano, antiviral, antioxidante entre otras (Möller *et al.*, 2008).

En la elaboración de ensilado químico artesanal se realiza un picado de las vísceras de pescado en una máquina picadora, para permitir un mejor contacto entre las partículas de vísceras y el ácido. Seguidamente, se incorpora los ácidos en cantidad suficiente hasta alcanzar un pH de 3,5 y se mezcla hasta homogenizar la pasta (Manca *et al.*, 2002).

4.2.1.1 Ácidos utilizados en ensilaje químico

En general cuando se habla de ensilaje ácido o ensilaje químico de pescado usualmente los ácidos más utilizados son el ácido sulfúrico y el ácido fórmico, sin embargo también se han realizado estudios en los cuales se han utilizado otros tipos de ácidos en mezcla tales como el ácido fosfórico y el ácido cítrico en concentraciones de 2.6% para ambos ácidos (Toledo *et al.*, 2010).

Anteriormente en la realización de ensilados los ensayos favorecieron el uso de ácidos minerales como clorhídrico, sulfúrico o fosfórico, pero estos, usados solos, demostraron ser malos preservadores del ensilaje, posteriormente se demostró que se puede obtener un buen ensilaje con mezclas de ácidos orgánicos tales como el fórmico, propiónico, cítrico (Machin, 1999).

4.2.2 Ensilaje biológico de pescado

Los ensilados biológicos o microbianos de pescado tienen como fundamento la producción de ácido por medio de la fermentación de carbohidratos gracias a la acción de las bacterias, a este ensilado se le adiciona una fuente de carbono y un microorganismo, este último es capaz de utilizar el azúcar como substrato y producir ácido láctico (Fao, 1992). Entre las fuentes de carbono utilizadas se encuentran harina de maíz, harina de avena, cebada, azúcar, malteada, arroz, yuca, melaza entre otras. Y entre los microorganismos productores de ácido láctico se encuentran: *L. plantarum*, bacterias lácticas del yogur y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como repollo, papaya, banana, piña, camote y yuca (Bello, 1997).

En la elaboración del ensilado biológico se utilizan con frecuencia residuos de pescado resultantes del fileteado y peces de bajo valor comercial, a estos residuos se le adiciona el fermento biológico para fermentar los azúcares y producir ácido láctico. En dicho proceso se da la preservación del residuo pesquero y también se produce una hidrólisis parcial de las proteínas (Ximenes, 2008).

En la alimentación animal los ensilados biológicos presentan ventajas gracias a que el pH alcanzado es superior a 4.1 en contraste con los ensilados químicos que llegan a alcanzar pH alrededor de 3, esto es un factor favorable ya que no requiere una posterior neutralización para la elaboración de dietas (Toledo *et al.*, 2006).

Estos tipos de ensilados son usados para subsistir la harina de carne y la harina de pescado en la preparación de raciones para aves, peces, ganado vacuno, porcinos, ovino, y otros animales (Padilla, 1996).

Una de las importancias del ensilado de pescado radica en su utilización para la formulación de raciones de bajo costo y alto valor nutricional. Este puede ser utilizado en la industria piscícola, contribuyendo a disminuir los costos de producción. También cabe resaltar que el ensilado biológico de residuos de pescado tiene un elevado valor nutricional, asemejándose con la composición de la materia prima que le origina, es por esto que también es utilizado para contribuir al desarrollo de la ganadería, la avicultura y la piscicultura regional, a través de la formulación de raciones eficientes, siendo utilizado como la principal fuente de proteína (Ximenes, 2008).

4.2.2.1 Melaza como fuente energética

En la elaboración de ensilaje biológicos de pescado son usadas varias fuentes de carbono, una de estas es la melaza o miel de caña. La melaza residual o melaza final es el subproducto de la industria azucarera del cual se ha substraído el máximo de azúcar, esta es el residuo que no cristaliza en el proceso de obtención del azúcar refinado, la melaza sin diluir se sitúa entre 80 y 90 grados Brix aproximadamente y pesa 1,39 kg por litro (Recursos, 2000). Esta es utilizada principalmente en la industria alcoholera y como alimento de ganado. La melaza forma parte del grupo de alimentos clasificados como energéticos junto con los cereales y sus subproductos, su principal característica es contener un alto nivel de energía aprovechable (Rojas, 2010).

La melaza también ha sido utilizada como sustrato iniciador en el cultivo de bacterias ácidos lácticas tales como el *L. plantarum* (Ossa *et al.*, 2010).

4.2.2.2 Cepas ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas son gram-positivas, anaerobias facultativas, catalasa negativa y no formadoras de esporas. Las funciones en la tecnología de alimentos son formación de sabor ácido, inhibición de organismos patógenos, gelificación de la leche, reducción del contenido de lactosa, formación de aroma y producción de gas requerido para la formación de “ojos” en los quesos, también han sido muy utilizadas como probióticos (Parra, 2010). Este tipo de bacterias han sido muy importantes gracias a su contribución al darle un valor agregado a los productos. Gracias a las propiedades metabólicas las bacterias ácido lácticas (BAL) desempeñan una importante función en la industria alimentaria (Axelsson, 2004), ya que contribuyen con el sabor, olor, textura y el valor nutricional de productos alimenticios. Entre este grupo de bacterias se encuentran los *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Estas son productoras de metabolitos ácidos orgánicos, sustancias preservantes, polisacáridos, vitaminas, endulzantes, olores y sabores (Parra, 2010).

Entre las bacterias ácido lácticas utilizadas en realización de ensilaje se tienen *L. plantarum*, *Hansenula montevideo*, bacterias lácticas del yogur y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como repollo, papaya, banana, piña, camote, yuca (Martinez, 2003).

Dentro de las bacterias anteriormente mencionadas se tiene que el *L. plantarum* es uno de los microorganismos más eficientes y recomendables en la elaboración de ensilaje biológico de pescado gracias a la estabilidad del proceso en la cual se han medido variables como: acidez, pH, consistencia, nitrógeno no-proteico, líquido exudado, humedad, grasa, proteína, cenizas, recuento de microorganismos aerobios mesófilos, mohos, levaduras, número más probable de coliformes totales, coliformes fecales, detección de *Salmonella* (Martinez, 2003).

4.3 Cinética de crecimiento microbiano

Cuando se inocula una bacteria en un medio y ha transcurrido un tiempo determinado se forman dos células, después de otro tiempo cuatro células y después ocho células; el tiempo que tarda una población bacteriana en duplicarse se llama tiempo de generación. Es por este motivo que es importante conocer la cinética de crecimiento de un microorganismo y de este modo predecir cómo va a evolucionar su crecimiento, cómo se va a ir consumiéndose el sustrato y cómo se van a ir acumulando los productos (Salvucci, 2010). En la figura 3 se presenta la curva típica de crecimiento microbiano.

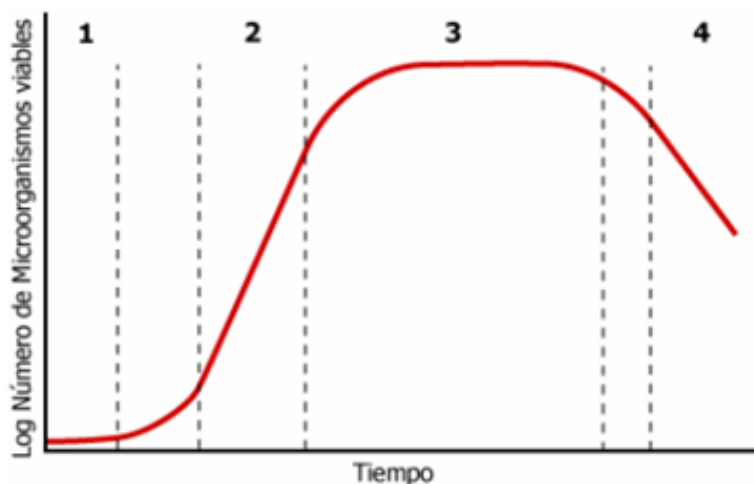


Figura 3. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana

Fuente: (Prescott *et al.*, 1999)

En esta figura se pueden observar las cuatro fases del crecimiento de un microorganismo, la fase (1) corresponde a la fase de latencia, en esta fase no hay un aumento significativo de la densidad celular, sin embargo puede ser acelerada si se inocula un cultivo que se encuentre en fase exponencial (Prescott *et al.*, 1999).

En la fase logarítmica (2), se da un periodo de crecimiento exponencial de la población bacteriana, en esta se alcanza la máxima velocidad de crecimiento.

En la fase estacionaria (3) el cambio en la densidad celular con respecto al tiempo no es significativo, entonces se da un equilibrio entre los microorganismos vivos y los que van muriendo.

Por último se encuentra la fase de muerte (4), en esta el equilibrio desaparece y predominan los microorganismos muertos, ya que no hay nutrientes para el recambio celular y las condiciones del medio de cultivo son adversas (*Prescott et al.*, 1999).

Cuando se realiza la curva del crecimiento microbiano se puede ver la evolución del número de células viables presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo de un tiempo determinado. En este se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo con una cantidad de nutrientes limitada (Departamento de inmunología, 2013).

La cantidad de microorganismos o biomasa formada, al igual que la cantidad de producto, es proporcional a la cantidad de sustrato gastado. Es por esto que se puede definir un coeficiente para cada tipo de bacterias, llamado coeficiente de producción Y , el cual se puede determinar experimentalmente dividiendo los gramos de biomasa obtenidos sobre los gramos de sustrato consumidos (Lozano, 2000).

En el crecimiento microbiano existen modelos que describen relaciones entre variables de estado y explican el comportamiento de un sistema, este puede dar sugerencias para el diseño de operación en una fermentación. Estos modelos están divididos en dos clases: estructurados y no estructurados. En los primeros las rutas metabólicas intracelulares de las células son tenidos en cuenta y en los segundos la biomasa generada la describe una variable. Los modelos estructurados usualmente son más difíciles de utilizar, en contraparte los modelos no

estructurados tienen la capacidad de describir muchos procesos de fermentación adecuadamente y son más fáciles de usar (Liu *et al.*, 2003). Dentro de los modelos no estructurados se encuentran el modelo de Monod, logístico, Moser, Contois y Fujimoto (Jakymec *et al.*, 2001).

4.3.1 Modelo de Monod

La mayoría de los modelos cinéticos que describen el crecimiento microbiano utilizan un enfoque empírico basado en la ecuación de Monod o en algunas de sus modificaciones. Monod relaciona la velocidad específica de crecimiento de determinado microorganismo (μ) con la concentración de sustrato (S), donde $\mu_{\text{máx}}$ es la velocidad máxima de crecimiento alcanzable cuando S es mucho menor que K_s y las concentraciones de todos los otros nutrientes son constantes, la constante K_s se conoce como la constante de saturación y es igual a la concentración del sustrato limitante de la velocidad cuando μ es igual a la mitad de su sustrato (Arellano, 2013).

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} S}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 1}$$

4.3.2 Modelo de Moser

El modelo de Moser se ha propuesto con el propósito de dar un mayor grado de ajuste a los datos experimentales (Duarte, 1998).

El modelo propuesto por H. Moser en 1958 se expresa mediante la ecuación:

$$\mu_x = \mu_M \frac{S^n}{K_s + S^n} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

n = es la constante empírica

μ_x = velocidad específica de crecimiento

μ_M = velocidad específica máxima de crecimiento

K_S = constante de saturación

4.3.3 Modelo de Contois y Fujimoto

El modelo propuesto por Contois en 1959 y Fujimoto en 1963 se explica en sistemas donde prevalecen altas concentraciones de biomasa cuyo crecimiento está acompañado por la producción de metabolitos o inhibidores tóxicos (Duarte, 1998).

$$\mu_x = \mu_M \frac{s}{K_S x + s} \quad \text{Ecuación 3}$$

Dónde:

μ_x = velocidad específica de crecimiento

μ_M = velocidad específica máxima de crecimiento

K_S = constante de saturación

x = concentración de biomasa en peso seco

4.3.4 Modelo logístico

La ecuación logística o modelo logístico, explica la evolución poblacional por medio del crecimiento exponencial, esta ecuación es muy utilizada para describir la cinética de crecimiento microbiana (Suárez *et al.*, 2007).

La ecuación logística puede ser descrita como sigue:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{mX} \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad \text{Ecuación 4}$$

La forma integrada de la ecuación (1) usando $X = X_0 (t = 0)$ da una variación sigmoideal de X como una función de t que puede representar tanto una exponencial y una fase estacionaria

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu m t}} \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde:

X_0 = concentración inicial de biomasa

X_m = concentración de biomasa máxima obtenida

μ_m = velocidad específica máxima de crecimiento

4.4 Diseño experimental superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para modelar y analizar problemas en los cuales una variable de interés es influenciada por otras. Esta técnica tiene como propósito diseñar un experimento que proporcione valores razonables de una variable respuesta y posteriormente determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos. Este tipo de diseño tiene como objetivo final establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta. Esto se logra al determinar las condiciones óptimas de operación del sistema (Piqueras, 2015).

Cuando se habla de un diseño experimental por la metodología de superficies de respuesta asume que existe una función polinomial de la forma:

$$\alpha_0 + \alpha_1 X_1 + \alpha_2 X_2 + \alpha_{12} X_1 X_2 + \alpha_{11} X_1^2 + \alpha_{22} X_2^2 \quad \text{Ecuación 6}$$

donde los α son coeficientes y las X variables independientes, ésta función relaciona las respuestas con las variables en el proceso (factores) (Valdez *et al.*, 2007). En el proceso del diseño experimental también es importante el análisis de

varianza (ANOVA), en este usualmente se utiliza un nivel de confianza del 95%, el cual incluye la significancia estadística de cada uno de los términos del modelo ajustado (Valor - P), los coeficientes estimados en cada término (α_i), el coeficiente de determinación del modelo (R^2) y la carencia de ajuste.

4.5 Secado solar como método de deshidratación

Cuando se habla de secado solar en alimentos se puede decir que esta es una operación unitaria destinada a la eliminación de humedad mediante aplicación de calor proveniente del sol. En este proceso se ven involucrados la transferencia de calor y de masa. Cuando el calor penetra en el alimento el agua de este se evapora, logrando de este modo disminuir el contenido de humedad y así alargar la el tiempo de vida útil del producto que se están secando (Belén *et al.*, 2007).

El método de secado solar es uno de los métodos más viejos para la preservación de los alimentos. Este se convierte en una alternativa cuando el costo del proceso juega un papel fundamental en la rentabilidad de la actividad productiva. La técnica tradicional, más utilizada por los agricultores, es la exposición directa del producto a la luz solar sobre planchas de metal o láminas de plástico negro (Almada *et al.*, 2005).

Por otro lado también se encuentran la utilización de secadores solares, estos contienen dos elementos básicos que son: un colector, donde la radiación producida por el sol calienta el aire, y este a la vez calienta la cámara de secado donde se encuentra el producto a deshidratar (Rosa, 1996).

Un papel importante en un secador solar lo juega la forma en la que la radiación solar interviene para deshidratar el producto, es por esto que un secador solar puede ser directo o indirecto. En este último (ver figura 4), el colector y la cámara de secado están separados y la radiación solar no incide sobre el producto. En este

se da un secado convectivo en el cual el sol actúa como fuente de energía para calentar el aire al interior del secador (Moreno, 2010).

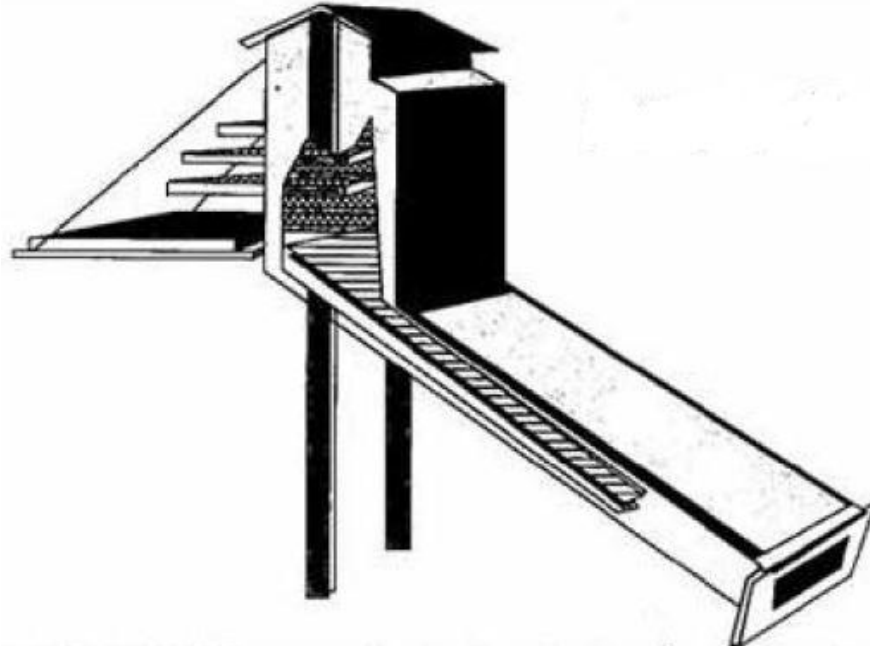


Figura 4. Secador solar indirecto.
Fuente: (Moreno, 2010)

En los secadores solares directos la cámara de secado y el colector pueden juntarse, es por esto que la cámara que contiene el producto también cumple la función de colector el cual recibe la radiación solar. La combinación de colector y cámara en una sola unidad puede ser más económica en muchos casos, especialmente en los secadores de menor tamaño (Moreno, 2010).



Figura 5. Secador solar directo
Fuente: (Moreno, 2010)

Cuando se realiza el proceso de secado solar la radiación incide sobre el producto, y suministra el calor necesario para la evaporación del agua libre contenida en el producto a secar, disminuyendo al mismo tiempo la humedad relativa del aire al interior del secador, lo que aumenta su capacidad de evacuación de vapor (Brenndorfer *et al.*, 1987). Cuando se diseña uno de estos secadores se debe utilizar una estrategia que permita lograr una buena combinación entre el conocimiento que se tiene del producto que se desea secar y el diseño del secador solar (Morsetto *et al.*, 2008).

Es importante resaltar que el método de secado solar es una alternativa útil en la elaboración de pellets obtenidos a partir de ensilajes de pescado, los cuales son destinados a alimentación animal. En el proceso de secado solar se busca simular y predecir la velocidad de secado en diferentes condiciones climáticas, y de esta manera entregar a los agricultores información útil, confiable y aplicable a las condiciones locales, y que pueda ayudarlos en la toma de decisiones (Jahn, 2003).

4.5.1 Determinación experimental de la velocidad de secado.

Para determinar experimentalmente la velocidad de secado de un material, se procede a colocar una muestra en una bandeja. Si se trata de material sólido se debe llenar por completo la base de la bandeja, de manera que sólo quede expuesta a la corriente de aire de secado la superficie de dicho sólido. La pérdida de humedad durante el secado puede determinarse a diferentes intervalos de tiempo, pesando la bandeja con el producto en una balanza (Clodoaldo *et al.*, 2008).

Al realizar experimentos de secado por lotes, deben tomarse ciertas precauciones para obtener datos útiles en condiciones que se asemejen lo más posible a las que imperaran en operaciones a gran escala. La muestra no debe ser demasiado pequeña y se debe introducir en una bandeja similar a la que se usará en producción. La relación entre superficie de secado y superficie de no secado (superficie aislada) así como la profundidad del lecho del sólido deben ser idénticas (Geankoplis, 1998).

Los datos que se obtienen de un experimento de secado por lotes, generalmente se expresan como peso total **W** del sólido húmedo (sólido seco más humedad) a diferentes tiempos. Estos valores se pueden convertir a datos de velocidad de secado por los siguientes procedimientos. Primero se debe calcular el contenido de humedad del producto en el tiempo t (Ecuación 7).

$$x_t = \frac{W_t - W_{ss}}{W_{ss}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Dónde:

X_t = contenido de humedad en el tiempo (kg_{agua}/ kg_{ss})

W_t = masa del producto en un tiempo t (kg)

W_{ss} = masa de sólido seco (Kg)

Después de haber establecido las condiciones de secado constante, se determina el contenido de humedad de equilibrio del producto (x^* kg de humedad de equilibrio/kg de sólido seco), y seguidamente se procede a calcular el contenido de humedad libre (X en kg de agua libre/kg de sólido seco) del producto para cada valor de X_t .

$$X = X_t - X^* \quad \text{Ecuación 8}$$

La cinética de secado del producto objeto de estudio se representa mediante un gráfico del contenido de humedad libre X en función del tiempo t en horas, como se muestra en la figura 6.

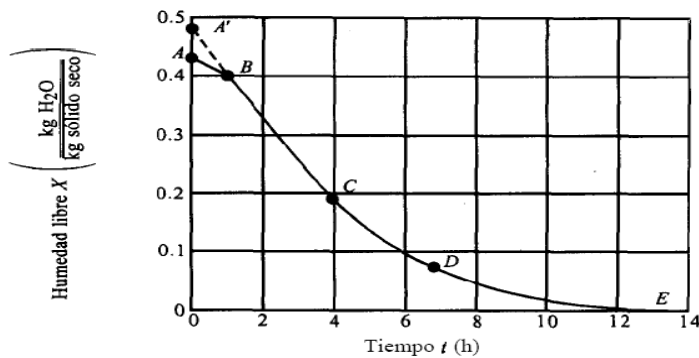


Figura 6. Curva típica de velocidad de secado constante

La curva de velocidad de secado del producto se obtiene al graficar la velocidad de secado R (ecuación 3) *versus* la humedad libre del producto.

$$R = - \left(\frac{w_{ss}}{A} \right) \frac{\Delta X}{\Delta t} \quad \text{Ecuación 9}$$

Dónde:

R : velocidad de secado ($\text{Kg}_{\text{agua}} / \text{m}^2 \cdot \text{h}$)

w_{ss} : masa de sólido seco (Kg)

A: área superficial expuesta al secado (m^2)

ΔX : diferencia de humedad libre en dos periodos de tiempo (Kg_{agua}/Kg_{ss})

Δt : delta de tiempo (h)

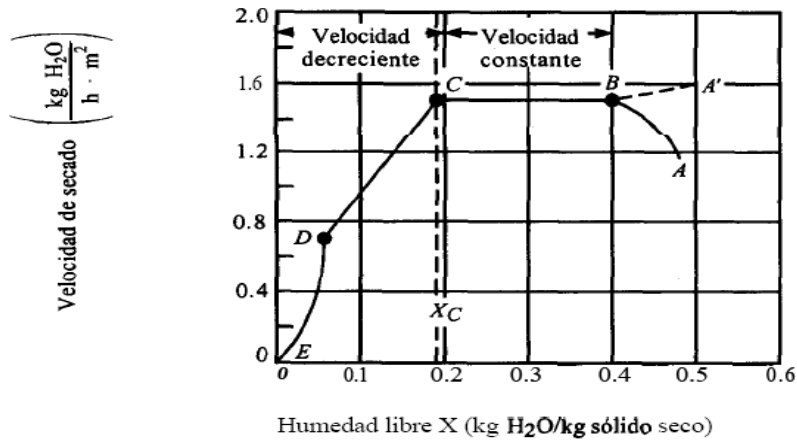


Figura 7. Curva velocidad de secado en función de la humedad libre del producto

En la figura 7 se muestra la curva de velocidad de secado para condiciones de secado constante, en el tiempo cero, el contenido de humedad libre corresponde al punto **A**. Al iniciar el proceso de secado del producto, el sólido está a una temperatura inferior de la que tendrá al final, y la velocidad de evaporación empieza a aumentar. En el punto **B**, la temperatura de la superficie alcanza su valor de equilibrio y en este punto se da inicio al *periodo de velocidad constante*, la pendiente de la curva es constante, hasta el punto **C**, donde la velocidad de secado comienza a disminuir, y en este punto se da inicio al periodo de velocidad decreciente, hasta llegar al punto **D**.

En el punto **C**, denominado contenido crítico de humedad libre X_c , ya no hay suficiente agua en la superficie del producto para mantener una película continua y la porción mojada comienza a disminuir durante el periodo de velocidad decreciente

hasta que la superficie queda seca en su totalidad (punto **D**). El segundo periodo de velocidad decreciente empieza en el punto **D**, cuando la superficie esta seca en su totalidad. El plano de evaporación comienza a desplazarse con lentitud por debajo de la superficie. El calor de evaporación se transfiere a través del sólido hasta la zona de vaporización. El agua evaporada atraviesa el sólido para llegar hasta la corriente de aire. En algunos casos no hay discontinuidad definida en el punto D, y el cambio de condiciones de secado de una superficie con humedad parcial a una superficie completamente seca, es tan gradual que no se detecta un punto de inflexión. Es posible que la cantidad de humedad que se elimina durante el periodo de velocidad decreciente sea bastante pequeña; no obstante, el tiempo requerido por lo general es largo (Geankoplis, 1998).

5. ESTADO DEL ARTE

Una de las formas más utilizada para procesar los subproductos pesqueros es mediante la elaboración de harina de pescado y la producción de ensilaje, sustituyendo este último gradualmente la harina de pescado, por ser una materia prima más económica y por mostrar buenos efectos en la producción animal (Norgaard *et al.*, 2015).

En la elaboración de ensilajes de pescado se han usados diferentes tipos de ácidos, los que pueden originarse de fermentaciones bacterianas, en las cuales se produce ácido láctico (Toledo *et al.*, 2006) o por la utilización de ácidos inorgánicos como clorhídrico y sulfúrico (Vidotti *et al.*, 2003), orgánicos como ácido propiónico, fórmico y sus mezclas (Goddard *et al.*, 2005) y mezclas entre inorgánicos y orgánicos tales como sulfúrico/fórmico y cítrico/fórmico (Lo *et al.*, 1992).

Por su parte los estudios realizados en ensilajes a partir de microorganismos se han centrado en estudiar diferentes tipos de bacterias ácido lácticas donde se ha evaluado su capacidad de acidificación en residuos de pescado (Ahmed *et al.*, 1996; Belli, 2009; Cira *et al.*, 2002; García Ramos, 2011), en otros estudios se ha hallado al género *Lactobacillus*, entre estos el *Lactobacillus buchneri* B-1837, *Lactobacillus arizonensis* B-14768 y *Lactobacillus plantarum* B-4496, como uno de los géneros más eficientes para reducir el pH, constituyendo estas cepas una alternativa promisoría para la fermentación de residuos pesqueros (Góngora *et al.*, 2012).

También se han realizado diversas investigaciones donde se ha estudiado diferentes fuentes de carbono en la preparación de ensilaje biológico, por su parte Lessi en 1995 preparó formulaciones de ensilado utilizando el suero de queso. Otros autores como Martínez en 2003 reportan el uso de harina de maíz y de avena.

Fernandez *et al* en 2013 utilizaron la miel en proporciones 10 y 15% para dos formulaciones de ensilaje biológico.

Sin embargo una gran mayoría de autores han utilizado la melaza de caña como fuente de carbono en la elaboración de ensilaje de pescado, Borghesi en 2004 realizó ensilaje de residuos tilapia con 12% de melaza de caña, por su parte Barrero en 2007 utilizó una proporción de melaza de caña entre el 12 y 15%, Holguin *et al* en 2009 estudiaron el efecto de 4 concentraciones de melaza de caña 5,10,15 y 20% en la obtención de ensilaje de pescado para alimentación animal.

Se han realizado estudios donde el ensilado de pescado se ha utilizado para alimentar diferentes tipos de animales como bovinos (Barrero, 2007), cerdos (Norgaard *et al.*, 2015; Bermudez *et al.*, 1999), tilapia (Goosen *et al.*, 2014) bagre (Fagbenro *et al.*, 1995), y pollos de engorde (Santana *et al.*, 2008). Estos estudios han demostrado una buena digestibilidad en estos animales debido al tamaño de los péptidos obtenidos, lo cual los hace más fácilmente absorbidos que la proteína intacta (Gilbert *et al.*, 2008).

Varios autores han utilizado el sol como método para deshidratar ensilados y residuos de pescado. Padilla en 1996 utilizó la exposición directa al sol entre 24 a 48 horas para secar ensilaje de pescado, hasta obtener un rendimiento equivalente al 50% del peso inicial. Por su parte Lessi en 1995 utilizó la misma manera de secado por 48 horas hasta lograr que la humedad bajara de 74.80% a 53.20%. Rosa en 1996 utilizó un secador solar para conservar la fauna acompañante de la pesca artesanal, el proceso de secado duro 96 horas, y el producto final logro un porcentaje de humedad de 39.2 % aproximadamente.

En el caso de ensilaje de vísceras de cachama blanca se observan estudios como el de Bermudez *et al* en 1999, donde se realizó ensilaje de vísceras de esta especie para engordar cerdos, reemplazando la torta de soya en niveles de 50 y 75%,

mejorando la ganancia de peso y arrojando buenos resultados biológicos y económicos. Sin embargo, son muy pocos los estudios encontrados donde se elaboren ensilados a partir de esta especie y donde se realice la optimización tanto del ensilaje químico como biológico, lo que permite identificar una oportunidad de investigación ya que el presente trabajo contribuirá a la optimización de estos dos tipos de ensilaje y de esta manera conocer cuál es la mejor proporción de ácidos, melaza, lactosuero e inóculo a utilizar para obtener un producto de buena calidad.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Obtención de vísceras de cachama blanca

Las vísceras de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) fueron suministradas por una asociación de pescadores llamada Asopisan la cual se encuentra ubicada en el municipio de San Carlos (Antioquia). Las cachamas fueron sometidas a un día de ayuno antes del sacrificio. La recolección de las vísceras fue realizada en bolsas plásticas y fueron trasladadas al laboratorio Nutrición y tecnología de alimentos de la universidad de Antioquia en una nevera portátil con hielo seco. Dichas muestras fueron almacenadas en temperaturas de congelación a -18°C hasta su uso.

6.2 Estandarización ensilaje químico

Antes de la preparación de los ensilados, la vísceras fueron descongeladas y posteriormente fueron molidas en un procesador de alimentos (Black & Decker, EE.UU), seguidamente fueron homogenizadas de forma manual, posteriormente fueron incorporados los aditivos y los ácidos, ácido sulfúrico 96% w/v y ácido fórmico 85% w/v (Chemi, Colombia), como antioxidante Butil hidroxitolueno (BHT). En la determinación de los ácidos a utilizar se tuvieron en cuenta investigaciones como (Goosen, 2014; Norgaard, 2015; Vidotti, et al., 2003). Luego fueron mezclados utilizando una espátula plástica hasta obtener una pasta homogénea. Los ensilajes fueron almacenados a temperatura ambiente 25°C en frascos plásticos herméticos (Finlandek, Colombia) durante 10 días, los cuales fueron lavados y desinfectados previamente con hipoclorito de sodio a 600 ppm.

DIAGRAMA ENSILAJE QUIMICO



Figura 8. Diagrama elaboración ensilaje químico

6.2.1 Diseño experimental en el ensilaje químico

Para el ensilaje químico se desarrollaron 10 experimentos de acuerdo a un diseño Factorial Central Compuesto, tomando como factores la concentración de ácido sulfúrico (0-2 %) y ácido fórmico (0-2 %) y como variables respuesta los recuentos microbianos de mesófilos aerobios (UFC/g), mohos y levaduras (UFC/g), coliformes totales (NMP/g) y *E. coli* (NMP/g).

La metodología de superficies de respuesta asume que existe una función polinomial que relaciona las respuestas con las variables independientes en el proceso (factores) (Montgomery, 1991). Por esto, los datos experimentales obtenidos del diseño factorial (Tabla 1) se ajustaron a un polinomio de la forma de la ecuación 6 (Montgomery, 1991).

Se desarrolló el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, la cual incluye la significancia estadística de cada uno de los términos del modelo ajustado (Valor -P), los efectos estimados en cada término (α_i), el coeficiente de determinación del modelo (R^2) y la carencia de ajuste, con el fin de establecer la exactitud del modelo para representar los datos. Los modelos obtenidos se optimizaron para determinar los niveles de las variables que entregan los mínimos valores de las respuestas. Se utilizó el software Design Expert Versión 8.0.6 (Stat-Ease, EE.UU). Las corridas experimentales en forma aleatoria se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño central compuesto del ensilaje ácido de vísceras de cachama blanca.

| Corrida | Ácido sulfúrico (%) | Ácido fórmico (%) |
|----------------|----------------------------|--------------------------|
| 1 | 0 | 2 |
| 2 | 2 | 0 |
| 3 | 2 | 2 |
| 4 | 2,41 | 1 |
| 5 | 1 | 2,41 |
| 6 | 0 | 1 |
| 7 | 1 | 0 |
| 8 | 1 | 1 |
| 9 | 1 | 1 |
| 10 | 0 | 0 |

6.2.2 Análisis proximal

Tanto a los ensilajes como a las vísceras frescas se les realizaron los siguientes análisis bromatológicos: porcentaje de extracto etéreo, porcentaje de humedad, porcentaje de proteína y cenizas.

El contenido de humedad de las vísceras y ensilados se realizó en una estufa de aire forzado (Thermo, EE.UU), usando el método de secado en estufa 934.06 de la AOAC (Association of official analytical chemists, Official methods of analysis, 1980).

El porcentaje de extracto etéreo se realizó de acuerdo al método oficial AOAC 920.39, utilizando una unidad extractora soxhlet.

La determinación de cenizas totales se realizó usando el método oficial AOAC 942.05, en una mufla modelo D8 (Territeno, Colombia) en donde se calcinó la

muestra, a una temperatura de 550°C la cual permite la incineración de la materia orgánica, hasta la obtención de cenizas libres de carbón

Para la determinación del nitrógeno total se utilizó el método AOAC 954.01, este fue llevado a cabo en una unidad microkjeldhal (Velp Scientif, Italia) en donde se produce una digestión por medio de ácido sulfúrico 96%.

6.2.3 Determinaciones microbiológicas

Los análisis microbiológicos fueron realizados tanto a los ensilajes como a las vísceras, las pruebas se hicieron al día 0, 15 y 30 de la elaboración del ensilado cada una de ellas por triplicado, en estas se realizó conteo de mesófilos aerobios (NTC 4519, 2009) para este método se utilizó agar plate count (Merk, Alemania) después de sembrarse las muestras se incubaron de estufa de incubación (Boeco, Alemania) por 48 horas. También se realizó conteo de mohos y levaduras para según la (NTC 4132, 1997) en este ensayo también se tomaron los mismos días de medición que para el recuento de mesófilos aerobios, el agar utilizado fue agar ogy (Merk, Alemania), después de la siembra las muestras fueron almacenadas a 25°C durante 5 días, en el día quinto se realizó el conteo.

Para el conteo de coliformes totales y fecales se utilizó como referencia la NTC 4516 (Icontec, 2009), en este método se utilizó caldo LMX, las muestras se sembraron y se almacenaron a 35°C por 24 horas.

Por último se realizó una prueba de salmonella utilizando una prueba rápida de laboratorios Tecra™ y se siguieron las indicaciones del fabricante.

6.3 Ensilaje biológico

Para la preparación del ensilaje biológico de pescado al igual que en el ensilaje químico se trabajó con vísceras de Cachama blanca *Piaractus brachypomus* provenientes del municipio de San Carlos Antioquia, como fuente de carbono se utilizó melaza y suero lácteo, y *Lactobacillus plantarum* y cultivo liofilizado de yogurt ATCC 8014 como microorganismos formadores de ácido láctico.

6.3.1 Selección de las cepas

Las cepas evaluadas para la elaboración del ensilaje biológico fueron *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 el cual fue suministrado por el programa Ofidismo Escorpionismo de la Facultad de Química Farmacéutica de Universidad de Antioquia, también se evaluó cultivo liofilizado para la elaboración de yogurt DI PROX YBA 986 el cual fue suministrado por la empresa IPF de la ciudad de Medellín.

6.3.2 Activación de cepas

Las cepas de *L. plantarum* y YBA 986 fueron activadas previamente en 100 ml de caldo MRS (Man Rogosa y Sharpe) a 37 °C durante 12 horas en agitación, para esto se utilizó un agitador orbital con control de temperatura (Thermo scientific, EE.UU). Posteriormente fue realizada una dilución del microorganismo en dilución salina 0,85% hasta una absorbancia de 0.5-0.6 a 600 nm para luego finalmente sembrar 1 ml de esta dilución en 50 ml de caldo MRS. Cada dos horas se registró el crecimiento de cada uno de las cepas mediante la medición de la absorbancia a 600 nm y de este modo determinar cuál de los dos cultivos presenta un mejor crecimiento y con este realizar el diseño experimental de ensilajes biológicos.

6.3.3 Cinética microbiana

Una vez seleccionado el microorganismo para realizar los ensilajes biológicos, en el cual fue seleccionado como microorganismo el *L. plantarum*, se procedió a la realización de la cinética microbiana, para esta prueba se tomaron 3 erlenmeyer de 500 ml (Panesar *et al.*, 2007), se colocó en un agitador orbital a 150 rpm y 35°C durante 17 horas, cada dos horas se realizó una medición de producto metabólico (ácido láctico) consumo de azúcares y biomasa (células viables).

6.3.4 Consumo de azúcares

Durante la cinética microbiana se realizó seguimiento del consumo de azúcares por el método de DNS, Primero se procedió a la preparación del reactivo del ácido 3,5 Dinitrosalicílico, para esto se pesaron 5 g de ácido 3,5 dinitrosalicílico, 150 g de tartrato de Na-K y 8 g de NaOH. Se disuelve el NaOH en 200 ml de agua y se añadió en agitación el tartrato de Na-K lentamente.

Se completó hasta 400 ml y se comenzó a añadir lentamente el ácido 3,5 dinitrosalicílico. Se dejó en agitación toda la noche, y por último se completó el volumen hasta 500 ml (Bello *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta que se estaba trabajando con melaza la cual tiene un porcentaje de sacarosa entre el 60-65% se procedió a realizar una hidrólisis ácida de la melaza, paralelo a esto se realizó una curva patrón en donde se preparó una solución patrón de glucosa y se diluyó en concentraciones seriadas.

Se tomaron tubos de ensayos de 10 ml y se le adicionaron 1 ml de muestra y 1 ml de DNS, los tubos se sometieron a calentamiento durante 5 minutos, pasado este tiempo se frenó la reacción en un recipiente con hielo, posteriormente se pasó la muestra con el DNS a una celda espectrofotométrica y se realizó la lectura de densidad óptica (DO) a 540nm en un espectrofotómetro uv visible (Thermo, EE.UU) (Fajardo, 2007).

6.3.5 Recuento de bacterias ácido lácticas

Para el recuento de bacterias ácido lácticos se realizó por medio de diluciones decimales con agua peptonada estéril, para esto se sembraron 1ml en cada placa por duplicado en agar MRS (Pereira *et al.*, 2011), posteriormente las placas fueron incubadas a 35°C, el conteo se realizó en las placas que presentaban entre 30 y 300 colonias, y se registraron como unidades formadoras de colonias por mililitro.

Seguidamente se precedió a realizar una tinción de gram para hacer la identificación de las colonias en las placas.

6.3.6 Determinación de acidez titulable total como ácido láctico

Se realizó medición de la acidez titulable total expresada como ácido láctico, para esto se tomaron 2 g de ensilaje en un beaker de 100 mL y se adicionaron 50 mL de agua destilada, posteriormente se homogenizó la muestra en un agitador magnético (Boeco, Alemania), se adicionaron 3 gotas del indicador fenolftaleína y se realizó la titulación de la muestra con NaOH 0,1N hasta llegar a pH 8.3 donde se observa el cambio a color rosado, este procedimiento se realizó por triplicado y se reportó el promedio.

6.3.7 Calculo de parámetros productivos

6.3.7.1 Rendimiento observado de sustrato en producto Y_{ps}

Se calculó el rendimiento de sustrato en producto el cual está definido como los gramos de ácido láctico producidos sobre los gramos de glucosa consumida.

$$Y_{PS} = \frac{\text{Gramos de ácido láctico producidos}}{\text{Gramos de glucosa consumida}}$$

Ecuación 10

6.3.7.2 Rendimiento observado de sustrato en biomasa Y_{xs}

De igual forma también se calculó el rendimiento de sustrato en biomasa el cual se define como los gramos de biomasa obtenida sobre los gramos de glucosa consumida.

$$Y_{xs} = \frac{\text{Gramos de biomasa obtenida}}{\text{Gramos de glucosa consumida}} \quad \text{Ecuación 11}$$

6.3.8 Diseño experimental ensilaje biológico

Para la elaboración del ensilaje biológico se desarrollaron 13 experimentos de acuerdo a un diseño factorial central compuesto, tomando como factores la concentración de inóculo, concentración de melaza y concentración de suero lácteo y como variables respuesta los recuentos microbianos de mesófilos aerobios (UFC/g), mohos y levaduras (UFC/g), coliformes totales (NMP/g) y *E. coli* (NMP/g).

Se desarrolló el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95%, la cual incluye la significancia estadística de cada uno de los términos del modelo ajustado (Valor -P). Los modelos obtenidos se optimizaron para determinar los niveles de las variables que entregan los mínimos valores de las respuestas. Se utilizó el software Design Expert Versión 8.0.6 (Stat-Ease, EE.UU). Las corridas experimentales en forma aleatoria se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Diseño central compuesto del ensilaje biológico de vísceras de cachama blanca

| Corrida | Inóculo (%) | Melaza (%) | Lactosuero (%) |
|----------------|--------------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 8,0 | 6,0 | 6,0 |
| 2 | 4,5 | 6,0 | 14,5 |
| 3 | 4,5 | 6,0 | 0,0 |
| 4 | 2,0 | 12,0 | 12,0 |
| 5 | 2,0 | 0,0 | 0,0 |
| 6 | 4,5 | 6,0 | 6,0 |
| 7 | 4,5 | 0,0 | 6,0 |
| 8 | 4,5 | 6,0 | 6,0 |
| 9 | 7,0 | 12,0 | 0,0 |
| 10 | 1,0 | 6,0 | 6,0 |
| 11 | 7,0 | 0,0 | 12,0 |
| 12 | 4,5 | 6,0 | 6,0 |
| 13 | 4,5 | 14,5 | 6,0 |

6.3.9 Análisis proximal

El ensilaje biológico al igual que al ensilaje químico les realizaron los siguientes análisis bromatológicos: porcentaje de extracto etéreo, porcentaje humedad, porcentaje de proteína y cenizas según las normas anteriormente citadas en el numeral 6.2.2

6.3.10 Determinaciones microbiológicas

De igual forma que al ensilaje químico, al ensilaje biológico también se le realizó un seguimiento microbiológico donde las pruebas se hicieron en el día 10 después de su elaboración, cada una de ellas por triplicado, en estas se realizó conteo de mohos y levaduras según la (NTC 4132, 1997) en agar Ogy (Merk, Alemania),

después de la siembra las muestras fueron almacenadas a 25°C durante 5 días, en el día quinto se realizó el conteo. De igual modo también se realizó conteo de coliformes totales y fecales según NTC 4516 (Icontec, 2009).

6.4 Secado solar

6.4.1 Fabricación del secador solar

Para la realización del secador solar el primer paso fue una revisión bibliográfica, donde se analizaron las ventajas y desventajas en los diferentes diseños existentes, para el desarrollo del diseño uno de los factores principales que se tuvieron en cuenta fue el costo de construcción y operación, teniendo en cuenta que uno de los objetivos de este proyecto es implementar tanto el ensilaje que se desarrolle y su posterior secado con la comunidad de acuicultores del Municipio de San Carlos Antioquia.

Se evaluó la construcción de dos tipos de secadores solares, uno de tipo indirecto y uno directo, en el secador solar indirecto el colector y la cámara de secado están separados, en este el aire es calentado en el colector y la radiación solar no incide sobre el producto, el cual está en la cámara de secado, por lo que se realiza un secado convectivo en el cual el sol actúa como fuente de energía para calentar el aire al interior del secador.

Para este proyecto se trabajó con un secador directo debido a que en este tipo de secador la cámara de secado y el colector pueden juntarse, es por esto que la cámara que contiene el producto también cumple la función del colector que es el que recibe la radiación solar, se pensó en este tipo de secador ya que es más eficiente para este proceso de secado, donde los rayos del sol son absorbidos por el mismo producto y es por esto razón que se hace más rápida la evaporación del agua.

La combinación de colector y cámara en una sola unidad puede ser más económica en muchos casos, especialmente en los secadores de menor tamaño (Santo *et al.*, 2012).

6.4.2 Construcción del secador solar

Posterior al diseño se procedió a la construcción del prototipo de secador solar, para este se usó madera tipo triple, con la cual se construyó el armazón del secador, se eligió este material debido a que es una madera liviana, fácil de trabajar y también es un buen aislante, se utilizó en la parte delantera (cubierta) polietileno transparente de 4mm de grosor, se escogió el polietileno en vez del vidrio debido a que un material que se puede trabajar más fácil y permite un mayor manejo sin riesgo de quebrarse, en la parte trasera superior se utilizó un tubo de pvc de 1y ½ para dejar salir el aire con la humedad que arrastra del ensilado. Todo el secador fue pintado con pintura negra ya que esto ayuda a absorber eficientemente la radiación solar (Clodoaldo *et al.*, 2008).

6.4.3 Ensayos de secado solar

Durante el mes de abril del 2015 se realizaron los primeros ensayos para estandarizar el funcionamiento del secador solar, en estos ensayos se analizaron las lecturas de humedad relativa del ambiente y las temperaturas dentro y fuera del secador, en este mes no fue posible realizar las pruebas con el ensilaje debido a que se presentaron precipitaciones con mucha frecuencia, ya en el mes de mayo del mismo año se procedió a realizar los secados del ensilaje, para esto se tomó una bandeja de 40 cm de largo por 30 cm de ancho, se pesó un kg de ensilado y se dispuso encima la bandeja, la cual se introdujo dentro del secador para posteriormente ser secado.

Los datos de humedad relativa y temperatura fueron tomados con un Datalogger CEM DT-171. La humedad del material seco se midió por medio del método de lámpara halógena modelo MOC-63U (Shimadzu, EE.UU).

6.4.4 Análisis de bases nitrogenadas volátiles totales NBVT

En la determinación de las bases nitrogenadas volátiles totales se utilizó el protocolo establecido por el reglamento CE 2074/2005 de la Unión Europea.

Se pesó 10 g de muestra la cual fue molida con anterioridad, posteriormente se mezcló con 90 mL de solución de ácido perclórico al 6%, se homogenizó durante dos minutos y se filtró utilizando un papel filtro de 150mm.

50 mL del filtrado se transfirieron a un tubo de digestor kjeldahl y se adicionaron 5 gotas del indicador fenolftaleína y 10 mL de NaOH al 20%. Se llevó a arrastre por vapor en un destilador (Velp Cientifica, Italia) hasta recuperar 100 mL de condensado, este se recibió en un erlenmeyer con 100 mL de ácido bórico 3% y unas gotas de indicador de Tashiro, se valoró el condensado con una solución de ácido clorhídrico 0,01 N hasta obtener cambio de color, este procedimiento se realizó por triplicado y se reportó el promedio de las mediciones.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Caracterización fisicoquímica de las vísceras de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

Antes de la realización del ensilaje químico y ensilado biológico se procedió a caracterización vísceras por medio de análisis fisicoquímicos y microbiológicos. En la siguiente figura se puede observar las vísceras de Cachama blanca con las cuales es trabajo en este proyecto.

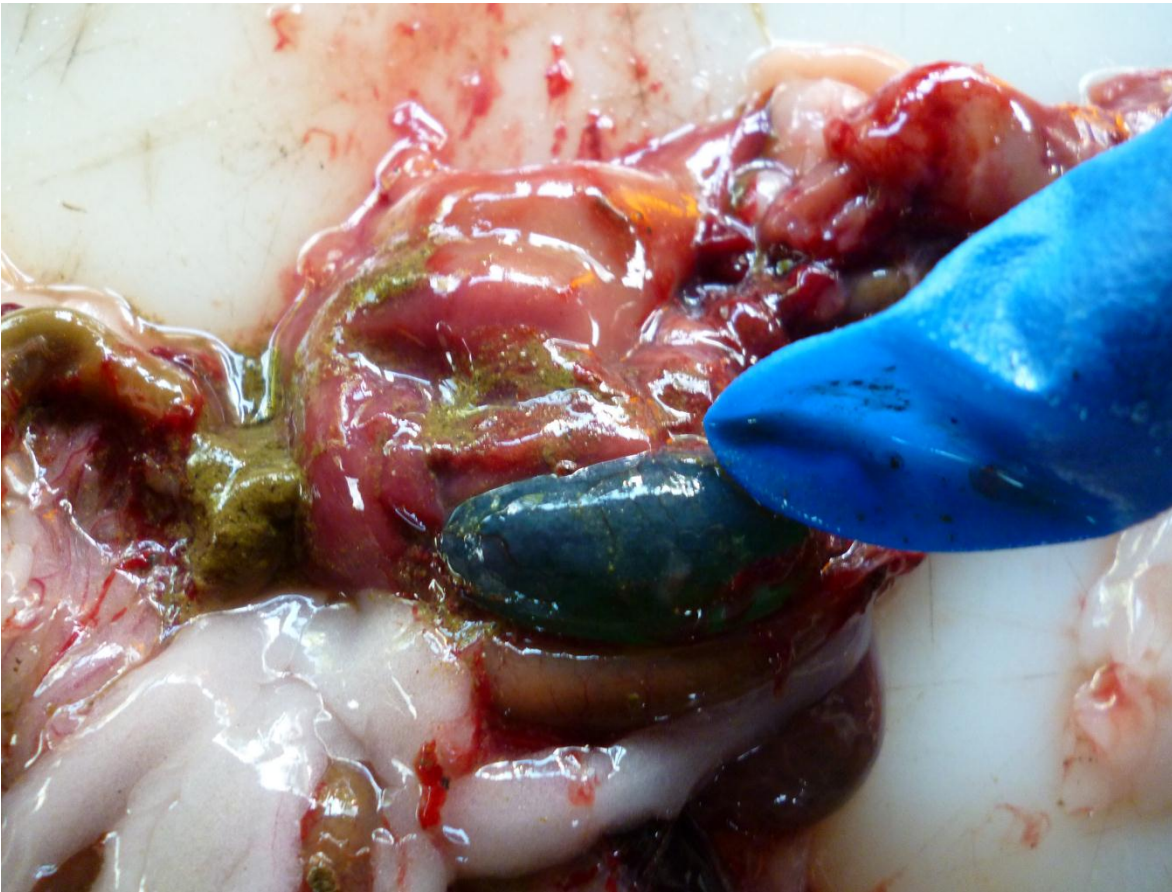


Figura 9. Vísceras de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*)

Fuente: Autor

En la imagen se puede observar restos de concentrado, sin embargo cabe resaltar que las vísceras usadas en esta investigación fueron recolectadas de peces que fueron sometidos a un día de ayuno, esto con el fin que la proteína presente en el concentrado no fuera un factor de error para los análisis realizados.

A continuación se presentan los resultados de los análisis fisicoquímicos de las vísceras de cachama blanca.

Tabla 3. Composición fisicoquímica de vísceras de cachama blanca en base humedad y en base seca

| | %Humedad media ± DE | %Proteína media ±DE | % Grasa media ± DE | %Cenizas media ± DE |
|-----------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| Base | | | | |
| humedad | 59.50 ±0,52 | 8.30±0.32 | 14.15±0.67 | 2.11±0.34 |
| Base seca | 1.46 ±0.08 | 20.49±0.79 | 30.80±1.6 | 5.21±0.33 |

El porcentaje de humedad en base humedad reportados en la tabla 3 son similares a los que presenta en su investigación (Martinez, 2003), el porcentaje de proteína reportado también coincide con el reportado por Bermudez *et al.* en 1999, sin embargo el porcentaje de grasa en base seca no coincide ya que Bermudez *et al* en 1999 reporta 49.2 de grasa en base seca en contraste con el 30.8 arrojado en nuestra investigación.

7.2 Estandarización del ensilaje químico

7.2.1 Diseño experimental ensilaje químico

En la Tabla 4 se muestran en forma aleatoria las corridas que se desarrollaron y las variables respuestas en cada corrida.

Tabla 4. Diseño central compuesto para ensilaje químico

| Corrida | % ácido sulfúrico | % ácido fórmico | Mohos levaduras UFC/g | Mesófilos aerobios UFC/g | Coliformes Totales NMP/g | E coli NMP/g |
|----------------|--------------------------|------------------------|------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------|
| 1 | 0.00 | 2,00 | 9,00E+03 | 1,30E+03 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 2 | 2.00 | 0,00 | 9,00E+04 | 9,00E+00 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 3 | 2.00 | 2,00 | 9,00E+00 | 9,00E+00 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 4 | 2.41 | 1,00 | 9,00E+00 | 9,00E+00 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 5 | 1.00 | 2,41 | 9,00E+00 | 9,00E+00 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 6 | 0.00 | 1,00 | 1,56E+04 | 3,20E+05 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 7 | 1.00 | 0,00 | 1,17E+04 | 3,10E+05 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 8 | 1.00 | 1,00 | 9,00E+00 | 9,00E+00 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 9 | 1.00 | 1,00 | 9,00E+00 | 9,00E+00 | 2,00E+00 | 2,00E+00 |
| 10 | 0.00 | 0,00 | 3,00E+05 | 1,80E+08 | 9,00E+03 | 2,00E+00 |

Es posible diferenciar en el caso de los mohos y levaduras que cuando en un tratamiento se ha utilizado uno de los ácidos ya sea sulfúrico y fórmico en una concentración de 1%, no se logra una disminución sustancial en la cantidad de estos microorganismos, presentando un valor máximo el tratamiento número 6 con 1,56E+04 UFC/g y 3,20E+05 para mohos y levaduras y mesófilos aerobios respectivamente.

7.2.1.1 Efectos de los factores sobre las variables respuesta

A partir de los datos de la tabla 4, se realizó el ANOVA, que se presenta en la Tabla 5, la cual indica la significancia (valor-P) de cada uno de los factores y sus interacciones. Puede observarse que ambos ácidos tienen efectos significativos en el orden lineal y se tiene una interacción entre los dos términos lineales asociados a la concentración de ácido. Los valores de R^2 indican el adecuado ajuste de los datos experimentales a cada uno de los modelos obtenidos.

Tabla 5. Análisis de varianza (valor P) del diseño central compuesto

| Factor | mohos y levaduras UFC/g | Mesófilos aerobios UFC/g | Coliformes Totales NMP/g | E coli NMP/g |
|----------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| AS | 0,1341 | 0,0090 | 0,0008 | 0,0477 |
| AF | 0,0296 | 0,0502 | 0,0061 | 0,0125 |
| ASxAF | 0,0421 | 0,0132 | 0,0266 | 0,0274 |
| R ² | 0,8393 | 0,9045 | 0,9695 | 0,9102 |

Valor de significancia ($p < 0,1$)

A partir de los resultados de la ANOVA, se obtuvieron los polinomios que aparecen en las ecuaciones 4-7, en las que se eliminaron los efectos que no presentaron significancia ($P < 0,05$) dentro del modelo, estas ecuaciones corresponden a los mohos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. coli*.

$$\text{Log}_{10}(\text{mohos y le vaduras}) = +4.76120 - 1.82654 * \text{sulf} - 2.27139 * \text{form} + 1.1307 * \text{sulf} * \text{form}$$

Ecuación 12

$$\text{Log}_{10}(\text{Mesófilos aerobios}) = +6.20095 - 2.30444 * \text{sulf} - 1.69731 * \text{form} + 0.59949 * \text{sulf} * \text{form}$$

Ecuación 13

$$\text{Log}_{10}(\text{coliformes totales}) = +2.67478 - 1.92361 * \text{sulf} - 1.43175 * \text{form} + 0.33431 * \text{sulf} * \text{form}$$

Ecuación 14

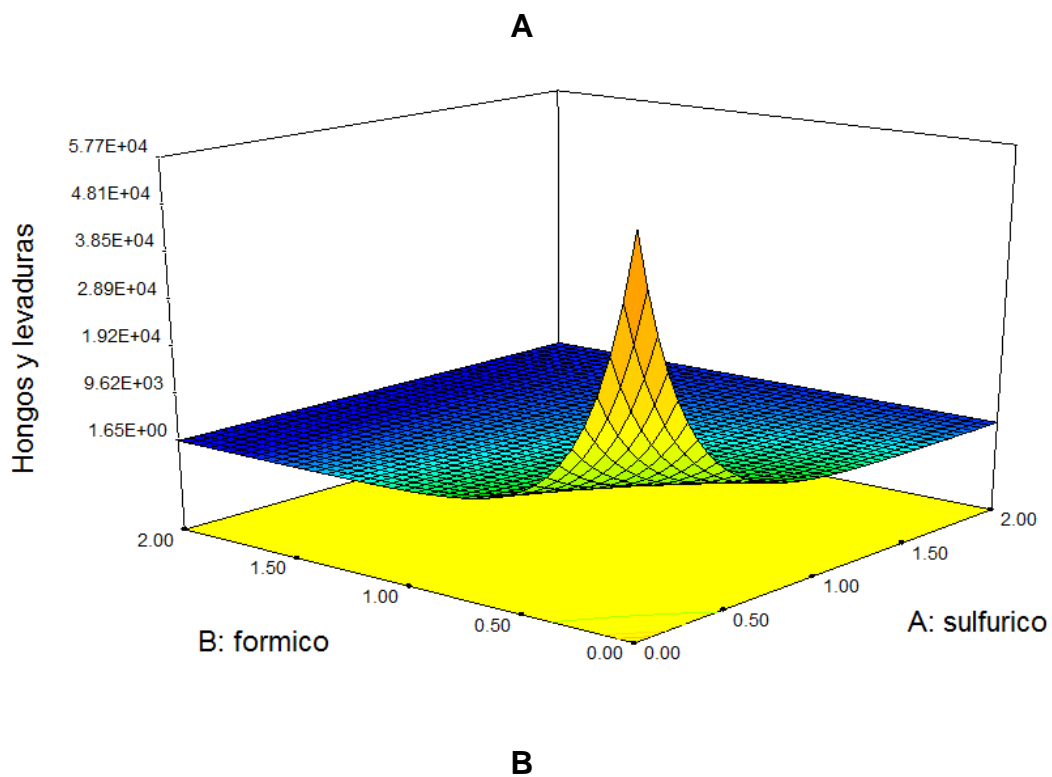
$$\text{Log}_{10}(\text{e.coli}) = +2.50288 - 1.34483 * \text{sulf} - 2.04042 * \text{form} + 0.55914 * \text{sulf} * \text{form}$$

Ecuación 15

El análisis de las ecuaciones 12-14, permite apreciar que las concentraciones de ácidos tienen efecto negativo sobre la concentración de todos los microorganismos,

lo cual se da fundamentalmente por el descenso del pH que tiene un efecto inhibitorio sobre la mayoría de los microorganismos (Wick et al., 2012).

En la Figura 10 y 11, se muestran los gráficos de superficie de respuesta para la cantidad de mohos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. Coli* respectivamente, en función de las concentraciones de ácidos. En los gráficos se observan una tendencia descendente en la cantidad de microorganismos a medida que se aumenta la proporción de ácidos y una vez superado el valor de 0.5 de ácido fórmico con 0,5 de ácido sulfúrico, se logra una disminución apreciable de todos los microorganismos nombrados anteriormente.



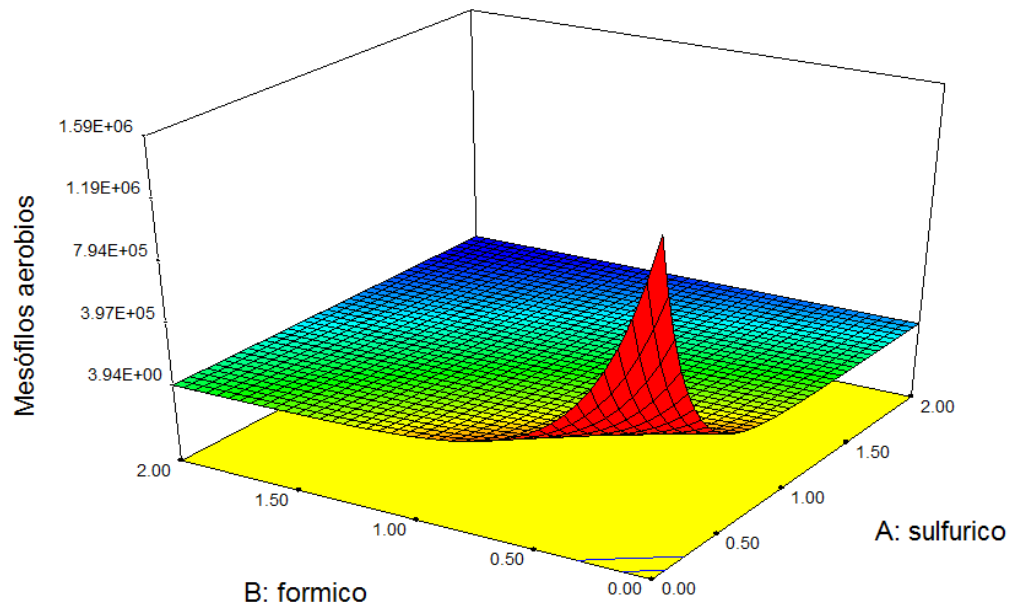
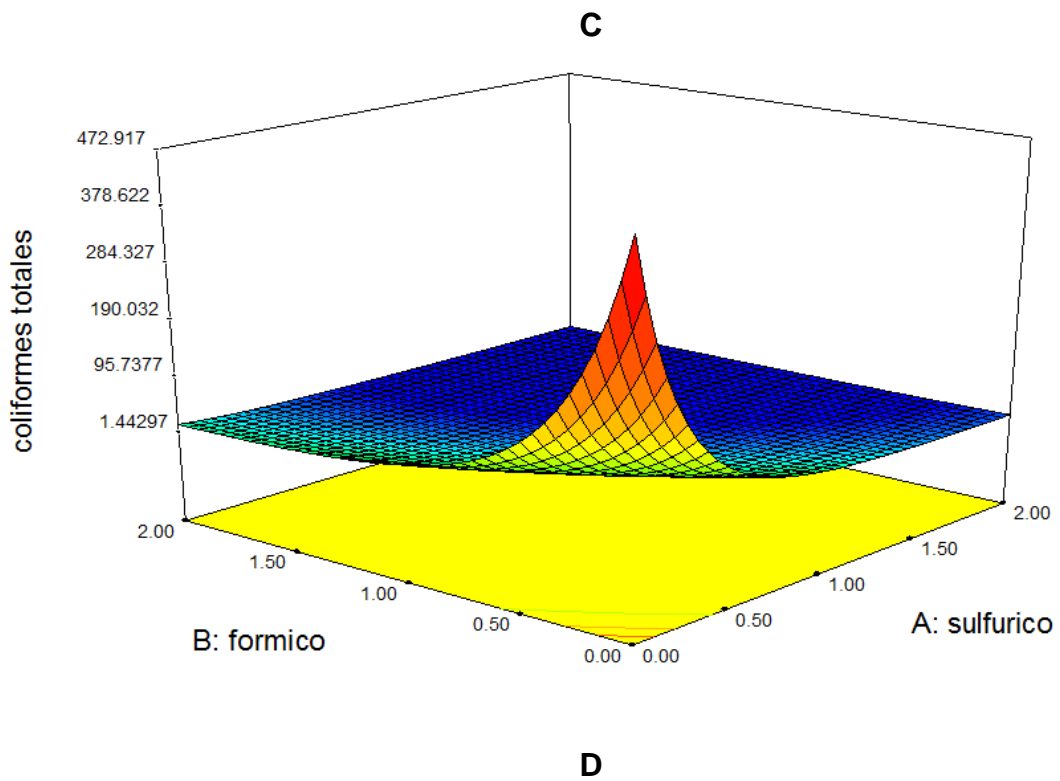


Figura 10. Superficie de respuesta para recuento de mohos y levaduras (UFC/g) (A), Mesófilos aerobios (UFC/g).



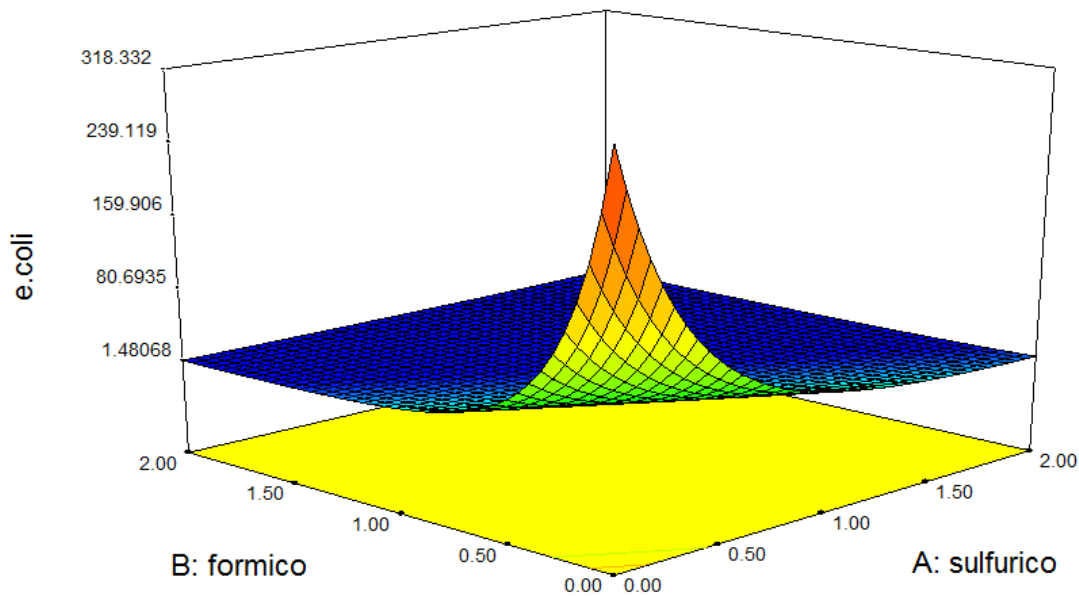


Figura 11. Superficie de respuesta para recuento de coliformes totales NMP/g (C) y *E. coli* NMP /g (D), en ensilado ácido en función del % de ácido sulfúrico y el % de ácido fórmico

7.2.1.2 Optimización y validación ensilaje químico

Los modelos obtenidos a partir de la minimización de la cantidad de microorganismos se sometieron a un procedimiento de optimización con el fin de predecir los niveles de los factores que minimizarán la cantidad de mohos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. coli*. Los valores óptimos predichos se validaron experimentalmente, donde se realizó recuentos microbianos para compararlos con los estimados mediante el software Design Expert. En la Tabla 6 se presentan los valores óptimos de las variables independientes, así como también, la cantidad de ácido utilizado para lograr la cantidad predicha.

Tabla 6. Valores óptimos predichos y experimentales en la optimización del porcentaje de ácido sulfúrico y ácido fórmico

| Variable | Óptimo % | | | |
|-----------------|-----------------|--|--|--|
| Ácido sulfúrico | 1 | | | |
| Ácido fórmico | 2 | | | |

| | Mohos y levaduras UFC/g | Mesófilos aerobios UFC/g | Coliformes Totales NMP/g | E coli NMP/g |
|--------------------|------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Valor predicho | 4.51 | 5.05E+01 | 2.41 | 1.75 |
| Valor experimental | 10< | 10< | 3< | 3< |

En la Tabla 6 podemos observar que la cantidad de mohos y levaduras, mesófilos aerobios, coliformes totales y *E. coli* predicha son cercanos a los obtenidos experimentalmente, como sería de esperarse gracias a que la acción de los ácidos logra disminuir el pH en valores que logran inhibir el desarrollo de bacterias putrefactivas y patógenas (Mayer, 1999; Díaz Ríos, 2004). Estos resultados contrastan con estudios como el de Holguin *et al* en 2009 en donde se logró Inhibir varias tipos de bacterias indeseables en los ensilados entre ellas los coliformes fecales presentando un recuento <3.

7.3 Estandarización ensilaje biológico

7.3.1 Selección de las cepas

En el desarrollo del ensilaje biológico de vísceras de pescado se decidió trabajar con el microorganismo *L. plantarum* ATCC 8014 y un cultivo comercial para elaboración de yogurt (YBA 986). Estos dos cultivos son bacterias ácido lácticas y

son necesarias para que se lleve a cabo el proceso fermentativo que ocurre en este tipo de ensilado (Ximenes, 2008).

En esta investigación fueron evaluadas las cepas anteriormente mencionadas, en éstas se quería evaluar cuál de las dos reportaba mejores rendimientos tanto biomasa-sustrato como producto-sustrato, ambas cepas fueron probadas con el medio comercial MRS. El objetivo era conocer el desempeño metabólico tanto del *L. plantarum* como del YBA 986 para la transformación de la fuente de carbono en ácido láctico, teniendo en cuenta que esta es una de las variables más importantes en la elaboración de ensilaje biológico de pescado, ya que el ácido láctico producido ayuda a conservar el ensilado por medio de la inhibición de otras bacterias (Padilla, 1996).

En la Tabla 7 se muestran los resultados de los rendimientos obtenidos tanto de biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) como de producto-sustrato ($Y_{p/s}$) para las bacterias *L. plantarum* y cultivo liofilizado de yogurt YBA 986 los cuales se usaron en esta investigación.

Tabla 7. Evaluación de rendimiento para las cepas *L. plantarum* y cultivo liofilizado de yogurt YBA 986

| Parámetro | Microorganismo | |
|---|---------------------|---------------------------------------|
| | <i>L. plantarum</i> | cultivo liofilizado de yogurt YBA 986 |
| g/L ácido láctico producidos | 9.37±0.12 | 4.23±0.18 |
| concentración final de glucosa g/L | 7.24±0.35 | 16.56±0.27 |
| sustrato consumido | 19.76±0.21 | 10.43±0.29 |
| Y _{P/S} (g producto generado/g sustrato consumido) | 0.474 | 0.406 |
| Y _{X/S} g biomasa generada/g sustrato consumido | 0.0501 | 0.0207 |

De la Tabla 7 puede observarse que el rendimiento biomasa sustrato y el rendimiento producto sustrato fue mayor para el *L. plantarum* que para el cultivo liofilizado de yogurt YBA 986. La importancia de utilizar el caldo MRS para la escogencia del microorganismo a utilizar en el ensilaje biológico se da debido a que este es un medio adecuado y con una alta cantidad de nutrientes para propiciar el crecimiento de BAL (Wilches López, 2013).

También se puede observar que el cultivo *L. plantarum* 8014, mostro como resultado los mejores parámetros de producción de ácido láctico con respecto al cultivo YBA 986. Teniendo este primero un rendimiento sustrato producto Y_{P/S} de 0.474 frente a un 0.406 del cultivo YBA. También es importante la cantidad de ácido

láctico producido del *L. plantarum* 9.370 g/L en contraste con 4.234 g/L del cultivo YBA 986, esta producción de ácido láctico es más del doble que su competidor. Se puede explicar la mejor generación de ácido del *L. plantarum* con respecto al cultivo YBA, ya que el *L. plantarum* continúa creciendo a valores de pH bajos, alrededor de 4, aunque a un ritmo más lento, esto hace que sea más ventajoso para la fermentación cuando se trabajan procesos en estos valores de pH, lo que lo hace más conveniente a utilizar en la elaboración de ensilados biológicos en comparación con otras bacterias ácido lácticas (Fu *et al.*, 1999). Las diferencias encontradas entre estos dos tipos de cultivos tienen que ver con la capacidad biosintética y la perfecta adaptación en medios abundantes que presenta el *L. plantarum*, adicionalmente, al tamaño de su genoma el cual es 50% más grande que la mayoría de las bacterias ácido lácticas, por lo que presenta una capacidad metabólica más grande, lo que pudo haber conllevado hacia la obtención de rendimientos mayores que los obtenidos con el YBA (Georgieva *et al.*, 2014).

7.3.2 Elaboración ensilaje biológico

Teniendo en cuenta los rendimientos sustrato producto ($Y_{p/s}$) y los g/L de ácido láctico producidos se decidió continuar esta investigación utilizando como inóculo para la elaboración del ensilaje biológico el microorganismo *L. plantarum*.

Antes de realizar el diseño experimental para el ensilaje biológico fue necesario determinar las fases de crecimiento microbiano, de este modo se pudo conocer las horas en las cuales el microorganismo se encontraba en la fase de crecimiento exponencial, debido a que en esta fase las células se reproducen sin limitación de sustancias nutritivas a una velocidad máxima (Fu *et al.*, 1999).

En la Figura 12 se muestran los resultados de la evaluación del crecimiento del microorganismo *L. plantarum*. La fase exponencial de esta bacteria comienza aproximadamente a las 5h de incubación y termina a las 12 h con la fase estacionaria. Este intervalo de tiempo es el momento oportuno para la inoculación del microorganismo en el ensilaje biológico.

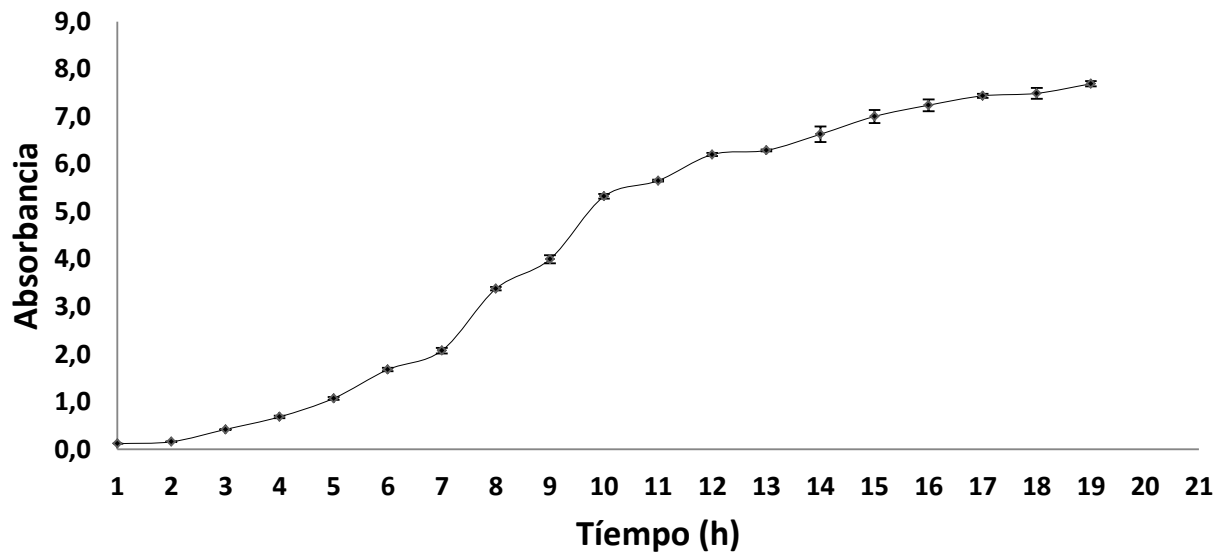


Figura 12. Curva de crecimiento de *L. plantarum* vs absorbancia en medio líquido MRS.

Posteriormente se procedió a realizar un diseño experimental donde se evaluó el efecto que tienen el porcentaje de inóculo (en fase de crecimiento exponencial), la concentración de melaza y de suero lácteo sobre las variables % ácido láctico obtenido, mohos y levaduras (UFC/g), coliformes totales (NMP/g) y coliformes fecales (NMP/g). Para esto se desarrolló el diseño central compuesto que se presenta en la Tabla 8, donde aparecen cada una de las corridas que se desarrollaron de forma aleatoria y la cantidad en porcentaje de ácido obtenido, expresado como ácido láctico, así como la concentración de microorganismos sobrevivientes expresada en UFC/g y en NMP/g.

Tabla 8. Diseño central compuesto para ensilaje biológico

| Corrida | A, %Inóculo | B, %Melaza | C, %lactosuero | % Ácido láctico | mohos y levaduras UFC/g | Coliformes Totales NMP/g | E coli NMP/g |
|---------|----------------|---------------|-------------------|-----------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| 1 | 8.04 | 6.00 | 6.00 | 3.93 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |
| 2 | 4.50 | 6.00 | 14.49 | 4.27 | 500.00 | 23.00 | 23.00 |
| 3 | 4.50 | 6.00 | 0.00 | 5.11 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |
| 4 | 2.00 | 12.00 | 12.00 | 4.81 | 50.00 | 200.00 | 23.00 |
| 5 | 2.00 | 0.00 | 0.00 | 3.45 | 100.00 | 23.00 | 23.00 |
| 6 | 4.50 | 6.00 | 6.00 | 4.66 | 50.00 | 23.00 | 23.00 |
| 7 | 4.50 | 0.00 | 6.00 | 4.65 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |
| 8 | 4.50 | 6.00 | 6.00 | 4.48 | 9.00 | 200.00 | 23.00 |
| 9 | 7.00 | 12.00 | 0.00 | 4.67 | 50.00 | 200.00 | 23.00 |
| 10 | 0.96 | 6.00 | 6.00 | 4.35 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |
| 11 | 7.00 | 0.00 | 12.00 | 4.45 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |
| 12 | 4.50 | 6.00 | 6.00 | 4.52 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |
| 13 | 4.50 | 14.49 | 6.00 | 4.42 | 9.00 | 23.00 | 23.00 |

De la tabla anterior se puede observar como el mejor tratamiento para la generación de ácido láctico es el tratamiento número 3 en donde solo se usa un 6% de melaza, 0% de lactosuero y 4.5% de inóculo, también se puede observar como este tratamiento tiene muy bajo los controles de mohos y levaduras y de coliformes totales y fecales. El bajo conteo en las bacterias anteriormente mencionadas también puede ocurrir debido a que algunos *lactobacillus* pueden producir compuestos antimicrobianos que ayudan a la conservación de las vísceras (Rai *et al.*, 2010).

7.3.2.1 Efectos de los factores sobre las variables respuesta

A partir de los datos de la Tabla 8, se realizó el ANOVA, que se presenta en la tabla 9, la cual indica la significancia (valor-P) de cada uno de los factores y sus interacciones.

Tabla 9. Análisis de varianza ANOVA (valor P) del diseño central compuesto ensilaje biológico

| Factor (%) | % Ácido láctico | Mohos y levaduras UFC/g | Coliformes Totales NMP/g |
|-------------------|------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| A | 0.0666 | 0.8837 | - |
| B | 0.2226 | 0.9486 | - |
| C | 0.0068 | 0.0025 | - |
| A*B | 0.0015 | 0.0047 | - |
| A*C | 0.0037 | - | - |
| A ² | 0.0039 | - | - |
| R ² | 0.96 | 0.8799 | |

Dónde: A inóculo, B melaza y C lactosuero
Valor de significancia ($p < 0,05$)

Puede observarse que la concentración de inóculo tiene efectos significativos en el orden lineal y también en las interacciones con la melaza y el lactosuero, también se puede observar que para el conteo de mohos y levaduras la interacción entre el inóculo y la melaza es muy significativa, con respecto a las variables respuesta coliformes totales y fecales se encuentra que los tratamientos no presentan diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.1460$).

Los valores de R², indican el adecuado ajuste de los datos experimentales a cada uno de los modelos obtenidos.

A partir de los resultados de la ANOVA, se obtuvieron los polinomios que aparecen en las ecuaciones 8 y 9, en las que se eliminaron los efectos que no presentaron significancia ($P < 0,05$) dentro del modelo, estas ecuaciones corresponden al % de ácido láctico y los mohos y levaduras en UFC/g.

De la Tabla 9 se puede observar como el % inóculo tiene un efecto positivo en la producción de ácido láctico tanto en su término lineal un ($p < 0.066$) como en su término cuadrático ($p < 0.0039$), para el caso de la melaza parece ser que en su término lineal no tuviera un efecto positivo en la formación de ácido láctico, sin embargo cuando vemos la interacción con el inóculo se puede apreciar su significancia ($p < 0.015$), lo cual concuerda con los resultados de Ossa *et al.*, 2010, donde se obtuvieron buenos resultados al crecer este microorganismo con diferentes concentraciones de melaza.

A continuación se presentan los modelos obtenidos para la producción de ácido láctico y recuento de hongos en el ensilaje biológico de pescado, los modelos para las variables respuestas coliformes totales y coliformes fecales no fueron significativos.

Modelos

Acido láctico = $+2.15613 + 0.73423 * inóculo + 0.2269 * melaza + 0.15541 * lactosuero - 0.040770 * inóculo * melaza - 0.033167 * inóculo * lactosuero - 0.010097 * melaza * lactosuero - 0.038890 * inóculo^2$ Ecuación 16

Hongos = $+291.89972 - 80.99005 * inóculo - 60.02454 * melaza - 0.34311 * lactosuero + 13.28212 * inóculo * melaza + 2.47973 * lactosuero^2$ Ecuación 17

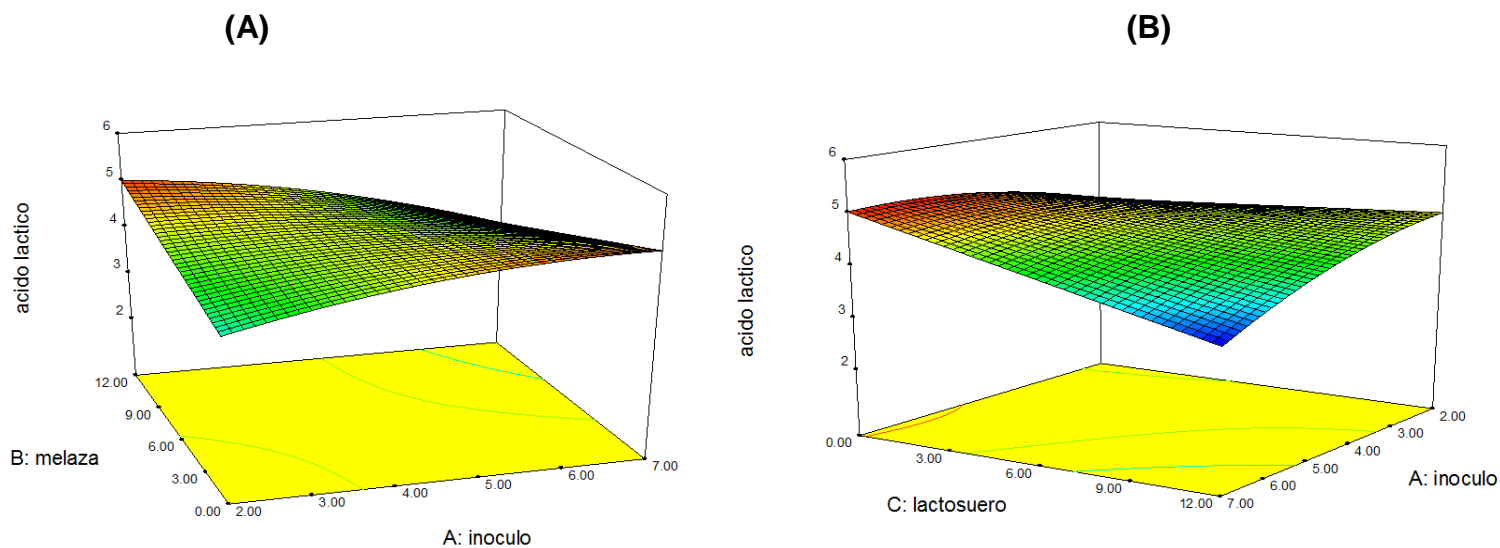


Figura 13. Superficie de respuesta para % de ácido láctico en ensilado biológico de pescado en función del % de melaza y el % de inóculo (A), y del % de lactosuero y el % de inóculo (B)

En la Figura 13 A de superficie de respuesta se puede observar que a medida que % de melaza aumenta también lo hace la producción del ácido láctico, teniendo este un porcentaje máximo cercano a 5% cuando el % de melaza es 12, también se puede ver que los puntos máximos de producción de ácido láctico están cuando el % de melaza está por encima de 9% el % de inóculo por debajo de 4%. Estos resultados concuerdan con el comportamiento metabólico del microorganismo *L. plantarum*, el cual al ser homofermentativo produce ácido láctico como producto mayoritario de la fermentación (Montano *et al.*, 1992). En contraste a esto cuando se observa la Figura 13 B nos muestra que entre mayor lactosuero e inóculo hayan, la variable respuesta ácido láctico decrece, en esta interacción se podría estar presentado inhibición por sustrato (Mora N., 2007).

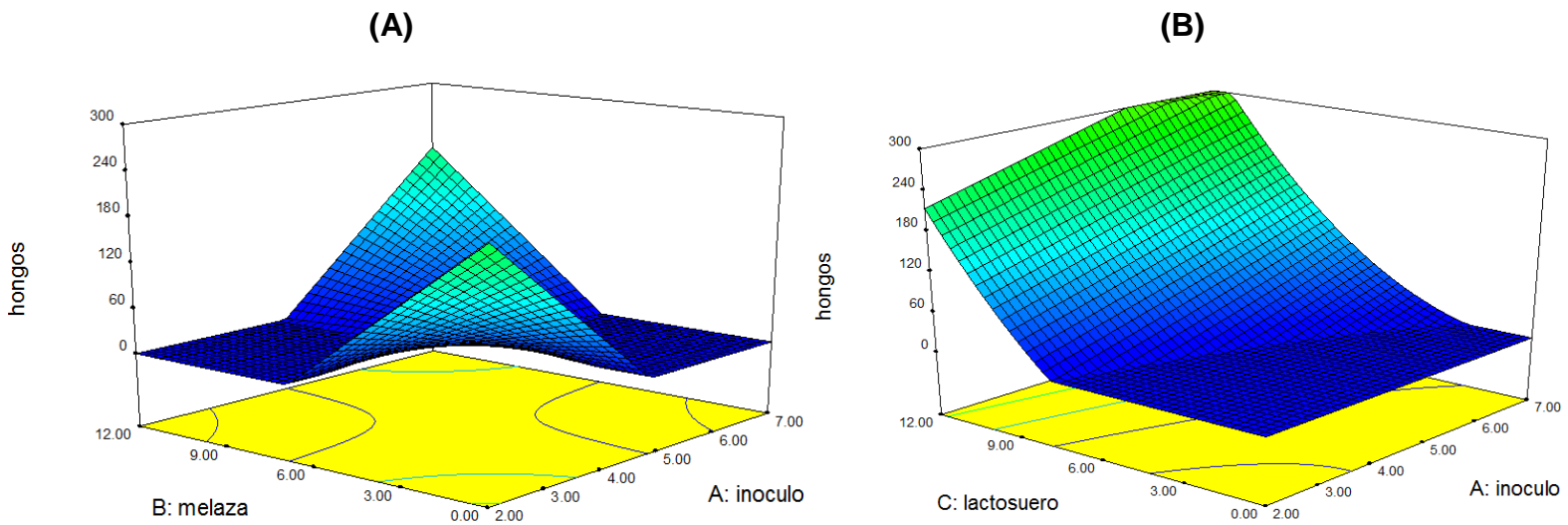


Figura 14. Superficie de respuesta para recuento de hongos UFC/g, en ensilado biológico de pescado, en función del % de melaza y el % de inóculo (A), y del % de lactosuero y el % de inóculo (B).

De forma similar que en las anteriores gráficas se puede observar como la relación melaza- ácido láctico es más significativa para tener un bajo recuento de hongos que la relación lactosuero inóculo, al parecer estos dos sustratos están teniendo un efecto antagónico, teniendo un mejor comportamiento la melaza para las variables de interés en los ensilajes biológicos (Ossa *et al.*, 2010).

7.3.2.2 Optimización y validación diseño experimental ensilaje biológico

Los modelos obtenidos a partir de la maximización del ácido láctico y de minimización de la cantidad de microorganismos para este caso hongos, se sometieron a un procedimiento de optimización con el fin de predecir los niveles de los factores que maximizaran y minimizaran las variables anteriormente mencionadas. Los valores óptimos predichos se validaron experimentalmente. En la Tabla 10 se presentan los valores óptimos de las variables independientes, así como también, el % de inóculo, % de melaza y de lactosuero a utilizar para lograr la cantidad predicha.

Tabla 10. Valores óptimos predichos y experimentales en la optimización del porcentaje de inóculo, melaza y suero lácteo

| Variable | Óptimo % | | |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>Inóculo</i> | 3.01 | | |
| Melaza | 11.69 | | |
| Suero lácteo | 0.38 | | |
| | Ácido láctico % | Mohos y levaduras UFC/g | Coliformes Totales NMP/g |
| Valor predicho | 5.20 | 9 | 21 |
| Valor experimental | 4.3 | 10< | 23 |

En la Tabla 10 podemos observar que la cantidad en el % de ácido láctico y el recuento de hongos predichos son cercanos a los obtenidos experimentalmente, este resultado nos indica que en la elaboración del ensilado biológico se puede omitir el suero lácteo ya que la interacción entre la melaza y el inóculo son suficientes para generar el resultado esperado. Estos resultados son similares a los reportados por Holguin *et al* en 2009 donde ensayo proporciones de melaza de (5,10,15 y 20%) encontrando la proporción de 15 % melaza como la más indicada para lograr un ensilaje con características de acidez deseadas.

7.3.3 Cinética microbiana *L. plantarum* en ensilaje biológico óptimo

Una vez realizado el diseño experimental del ensilaje biológico y encontrado el tratamiento óptimo para maximizar el % de ácido láctico y minimizar el recuento de hongos, se procedió a realizar la cinética microbiana del microorganismo *L. plantarum* en ensilaje de biológico de pescado.

La cinética microbiana se realizó en un ensilaje con la formulación entregada por el procedimiento de optimización:

Tabla 11. Formulación ensilaje biológico óptimo

| %Visceras | %Inóculo | % Melaza | % lactosuero |
|-----------|----------|----------|-----------------|
| 85.3 | 3.01 | 11.69 | 0.38 |

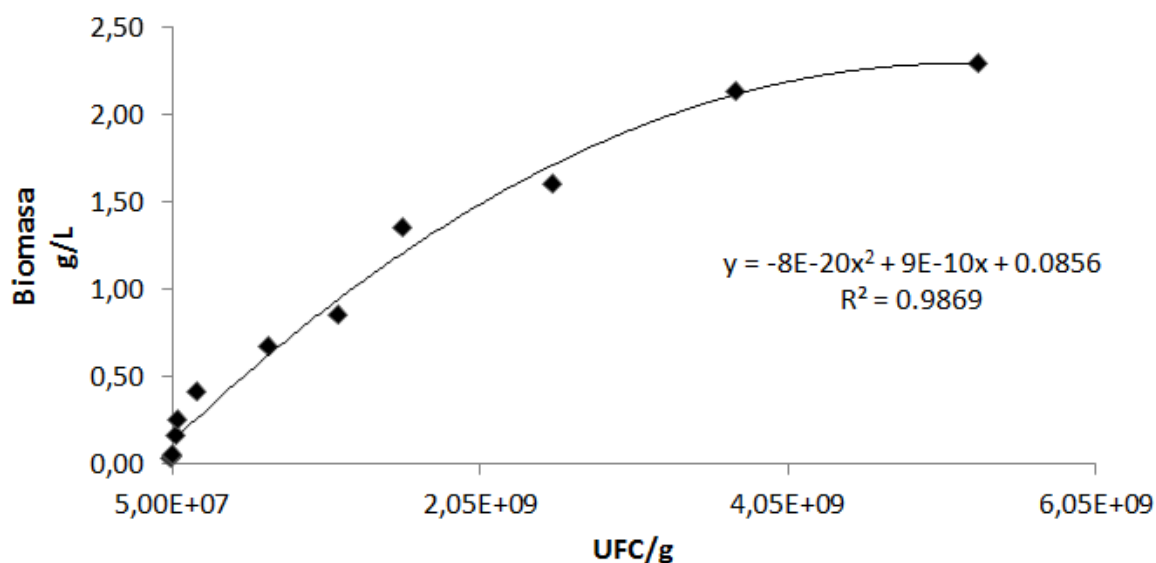


Figura 15. Curva de correlación de peso seco g/L con UFC/g para el microorganismo *L. plantarum* en medio MRS

Par el cálculo de la concentración de microorganismo se desarrolló una curva patrón que estableciera la correlación de los g/L de biomasa y las UFC, en medio sintético MRS para el microorganismo *L. plantarum*, la curva arrojó una ecuación polinómica de segundo grado la cuál fue útil para evaluar el comportamiento del microorganismo, en términos de g/L de biomasa en el ensilado biológico; teniendo en cuenta que en el ensilaje es compleja la medición directa de la biomasa en g/L, ya que las vísceras intervienen en la medición de peso seco del microorganismo.

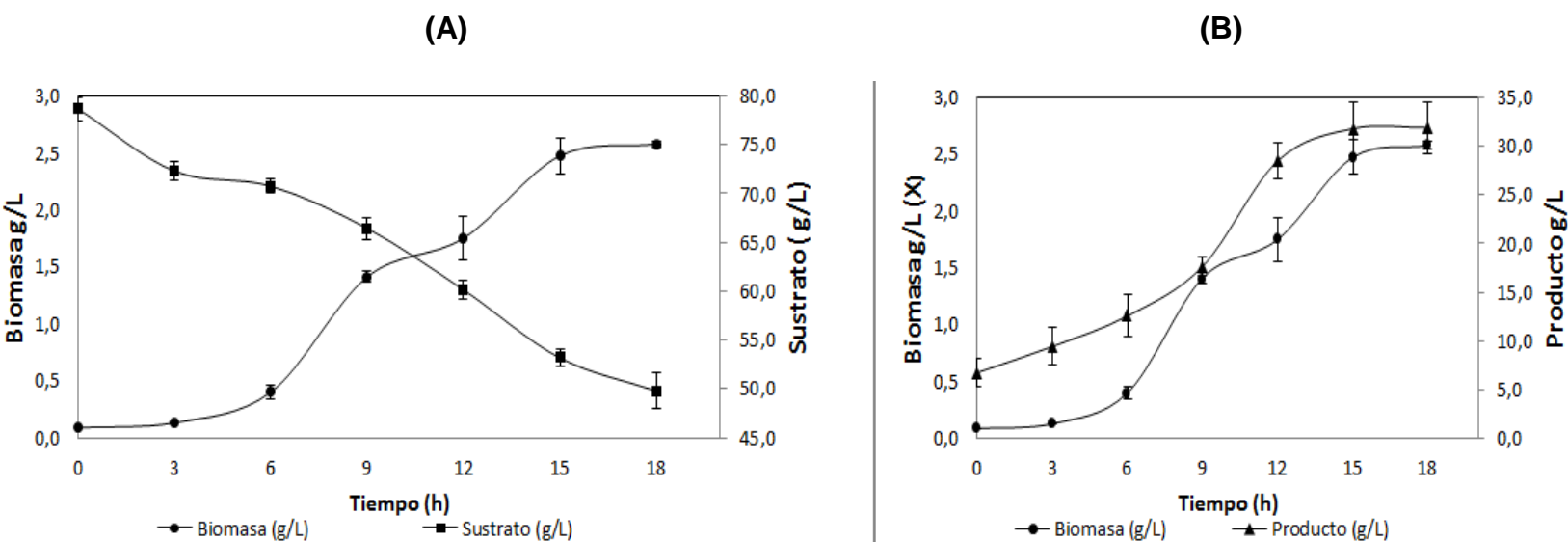


Figura 16. Cinética del comportamiento del *Lactobacillus plantarum* en el ensilaje biológico de pescado optimizado (A) concentración de biomasa y de sustrato versus el tiempo. (B) concentración de biomasa y de producto versus el tiempo.

En la figura 16 (A) se observa las diferentes fases de crecimiento del *L. plantarum* en el ensilaje biológico óptimo, en las primeras 4h de la fermentación se da un proceso de adaptación del microorganismo a las condiciones fisicoquímicas del medio, después de este tiempo se dio inicio a la fase de crecimiento exponencial que finalizó a las 15h, este comportamiento es similar al observado cuando el microorganismo se inoculó en el medio sintético MRS (Ver Figura 12) donde se observa una fase exponencial que termina a partir de la hora 14.

El microorganismo alcanza la fase estacionaria cuando la concentración de biomasa es igual a 2.598 g/L, similar a lo reportado por (Suárez Zuluaga & Escobar, 2007).

También se puede observar en esta misma figura como el aumento en la concentración de biomasa presenta una relación inversa con respecto a la concentración de sustrato el cual disminuye desde una concentración de 78.64 g/L hasta 49.78g/L en un periodo de 18 h. allí se puede ver claramente lo reportado por

(Nielsen *et al.*, 1992) en donde los microorganismos requieren una fuente de sustrato para sintetizar nuevo material celular, así como para proporcionar energía a la misma célula.

La producción del ácido láctico en la fermentación tuvo un comportamiento similar al de la generación de biomasa, lográndose una concentración final de 31.89 g/L, concentración que permaneció aproximadamente constante entre las 15 y las 18 h. Otros autores como Arellano en 2013 quien trabajo con *Lactobacillus casei* y suero lácteo reporta valores de concentración máximos pasadas 24 horas de fermentación de 18.297 g/L.

Estos resultados nos indican en que *L. plantarum* se adaptó a las condiciones del ensilado biológico en el cual se estaba dando la fermentación, ya que se ve con claridad que a medida que transcurre el tiempo su masa celular va aumentando y va generando ácido láctico, el cual es un producto de gran interés para la conservación del ensilaje (Holguin *et al.*, 2009; Belli Contreras, 2009).

Para el cálculo de velocidad específica máxima de crecimiento (μ_m) se ajustaron los valores experimentales al modelo logístico (ecuación 5), teniendo en cuenta el trabajo de Suárez *et al* en 2007 donde evaluó la producción de ácido láctico con *Lactobacillus casei*. En la figura 17 se presenta la cinética de la biomasa ajustada al modelo logístico.

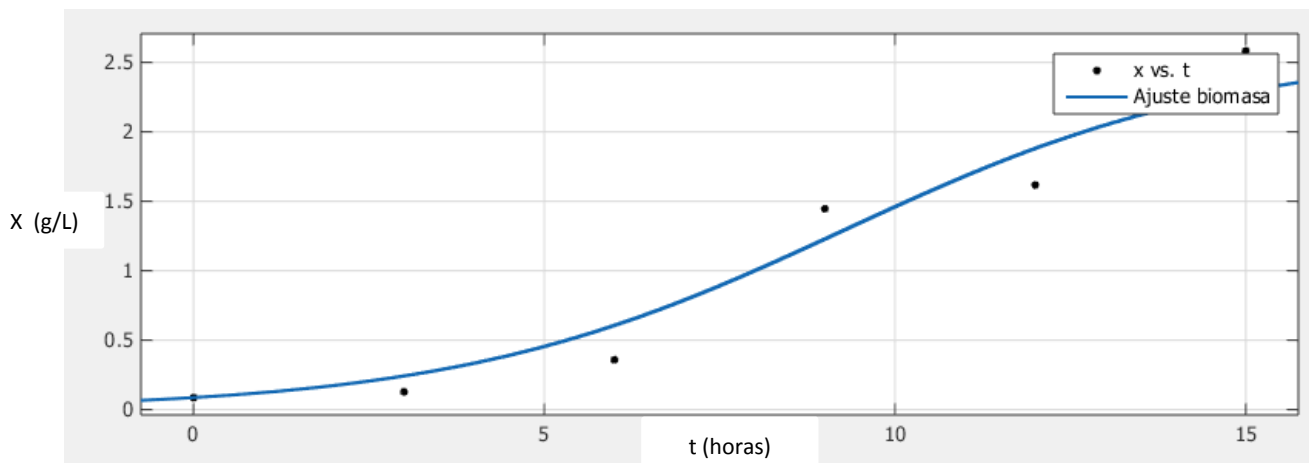


Figura 17. Cinética de biomasa ajustada al modelo logístico

Tal y como se ve en la figura 17, los datos experimentales para biomasa se ajustan a la forma integrada de la ecuación de crecimiento logístico dando como resultado un coeficiente de correlación $R^2 = 94.59$. A continuación se presenta la tabla 12 con los parámetros productivos en la fermentación del ensilaje biológico óptimo.

Tabla 12. Parámetros productivos en la fermentación del ensilaje biológico óptimo

| Parámetro | Valor |
|--|--------------|
| Acido lactico g/L | 31.89 |
| Y(p/s) g/L | 0.870 |
| Y(x/s) g/L | 0.086 |
| μ_m (h⁻¹) | 0.3611 |

Cuando se analiza la tabla 12 se puede observar una velocidad específica de crecimiento para la fase exponencial de 0.36 (μ_m) h⁻¹. Esta velocidad tiene una relación directa con la concentración de nutrientes en el medio, es por esto que a altas concentraciones el crecimiento alcanza valores máximos fijados por la cinética

intrínseca de las reacciones intracelulares, las cuales están relacionadas en la transcripción y traducción del DNA. También cabe anotar que el *L. plantarum* es un microorganismo que en condiciones óptimas de crecimiento puede llegar a tener una velocidad máxima específica de crecimiento mayor a 0,5 (μm) h^{-1} , pero esta velocidad depende de variables como temperatura, pH, concentración del sustrato y del producto (Fu *et al.*, 1999).

7.4 Escalamiento ensilado ácido de vísceras de cachama blanca a escala de 7 kg



Figura 18. Ensilaje ácido óptimo de vísceras de cachama blanca
Fuente: Autor

Teniendo en cuenta la optimización del ensilaje ácido arrojada por el diseño experimental por superficie de respuesta se procedió a el escalamiento del proceso en baldes de 7Kg los cuales fueron lavados y desinfectados previamente.

Después de 10 días de almacenamiento se procedió a medir las características fisicoquímicas y microbiológicas, los resultados se presentan en las tabla 13

Tabla 13. Recuento microorganismos ensilaje químico óptimo

| Recuento mesófilos aerobios UFC/g | Recuento Hongos levaduras UFC/g | Coliformes totales NMP/g | Coliformes fecales NMP/g | Salmonella sp presencia o ausencia | Clostridium sulfito reductor NMP/g |
|--|--|---------------------------------|---------------------------------|---|---|
| <10 | <10 | <3 | <3 | Ausencia | <3 |

Se puede observar que no hubo crecimiento de ninguno de los microorganismos evaluados, lo cual nos indica que el ensilaje se conservó adecuadamente por lo cual el tratamiento óptimo evaluado con 1% ácido sulfúrico y 2% de ácido fórmico es una mezcla adecuada para inhibir patógenos presentes en las vísceras de cachama blanca (Toledo Pérez *et al.*, 2010). Por su parte, se ha documentado que el ácido fórmico asegura la conservación del ensilaje sin provocar un descenso excesivo del pH, esto es de gran importancia ya que puede evitar la etapa de neutralización del producto antes de su empleo en la alimentación animal (Figuerola, 1997).

7.5 Secado solar del escaldo ensilado químico

Después de haber realizado el ensilaje ácido óptimo, se procedió a realizar el secado solar de este ensilaje, teniendo en cuenta que el ensilaje tiene una consistencia semi-líquida se requiere la adición de otros componentes para lograr la dureza del alimento, es por esto que decidió adicionar harina de trigo para darle una mejor consistencia tal como lo reportan otras investigaciones (Perez Guedez, 2014).



Figura 19. Mezcla de ensilaje ácido óptimo de vísceras de Cachama blanca con 30% de harina de trigo

Fuente: Autor

Durante dos meses se hicieron seguimientos de condiciones climatológicas en la ciudad de Medellín y su influencia en las temperaturas y la humedad relativas alcanzadas dentro y fuera del secador, se pudo observar que en promedio la temperatura dentro del secador oscilo entre 60 y 70 °C, y la humedad relativa entre un 6 y un 18 %, para el caso del ambiente la temperatura oscilo entre 27 y 35 °C y la humedad relativa entre 20 y 50 %, después de esto se procedió a realizar el secado de la base proteica .

El secador que se diseño para el secado de la mezcla de ensilado óptimo con harina de trigo (base proteica) es un secador por calentamiento directo, en el cual la energia solar se transforma en energia termica, donde el calentamiento de la camara de secado se produce a través de la exposición directa al sol

principalmente, pero también se logra al calentarse el aire en su interior el cual extrae la humedad de la base proteica (Santo *et al.*, 2012). En este diseño se decidió que la circulación del aire dentro del secador fuera por convección natural, en el cual el aire se mueve debido a la diferencia de densidad. La circulación forzada, donde se utiliza un ventilador para generar mayor turbulencia del aire no se tuvo en cuenta debido a que consume energía mecánica o eléctrica lo que ocasionaría un mayor costo al producto que se desea obtener, además también cabe resaltar que en algunas de las regiones del país no se cuenta con energía eléctrica constante ya sea por problemas de orden público o por deficiencia de las empresas prestadoras de la misma.



Figura 20. Construcción del secador solar
Fuente: Autor

Para realizar los secados de la base proteica se procedió a llevar la bandeja con la muestra dentro del secador solar, este se ubicaba en el espacio central del teatro al aire libre de la universidad de Antioquia, esta ubicación era estratégica para realizar las pruebas dentro de la universidad debido a que en ensayos previos se observó que el sol incidía la mayor parte del día sobre dicho lugar, también cabe

resaltar que no tiene arboles a los alrededores los cuales generarían sombra incidiendo negativamente en el secado.



Figura 21. Secado solar de la base proteica elaborada a partir de una mezcla de ensilaje ácido con harina de trigo

Fuente: Autor

En la figura 22 puede observarse el perfil de temperaturas al interior del secador y en el medio ambiente, al inicio del proceso de secado (8:00 am) se puede observar que ambas temperaturas son aproximadamente iguales y se nota un leve aumento de la temperatura ambiental a las 9:00 am desde 25.4°C hasta 35.2°C, manteniéndose aproximadamente constante hasta las 14:00 pm, periodo en el cual la temperatura ambiente empieza a disminuir hasta llegar a 27.2°C a las 6:00 pm. Al interior del secador hay un aumento considerable de la temperatura del aire

desde 26.3°C hasta un pico máximo de 64.9°C a las 11:00 am, alrededor del mediodía se da una disminución de la temperatura a un promedio 51.2 °C esto pudo ser ocasionado debido a que en ese momento el cielo tenía una alta nubosidad, sin embargo después de una hora esta se alejó permitiendo que el sol de nuevo incidiera sobre el colector del secador. Se puede observar en el segundo pico la temperatura máxima lograda al interior del secador la cual fue de 69.7 °C entre las 13:30 y 14:00 pm.

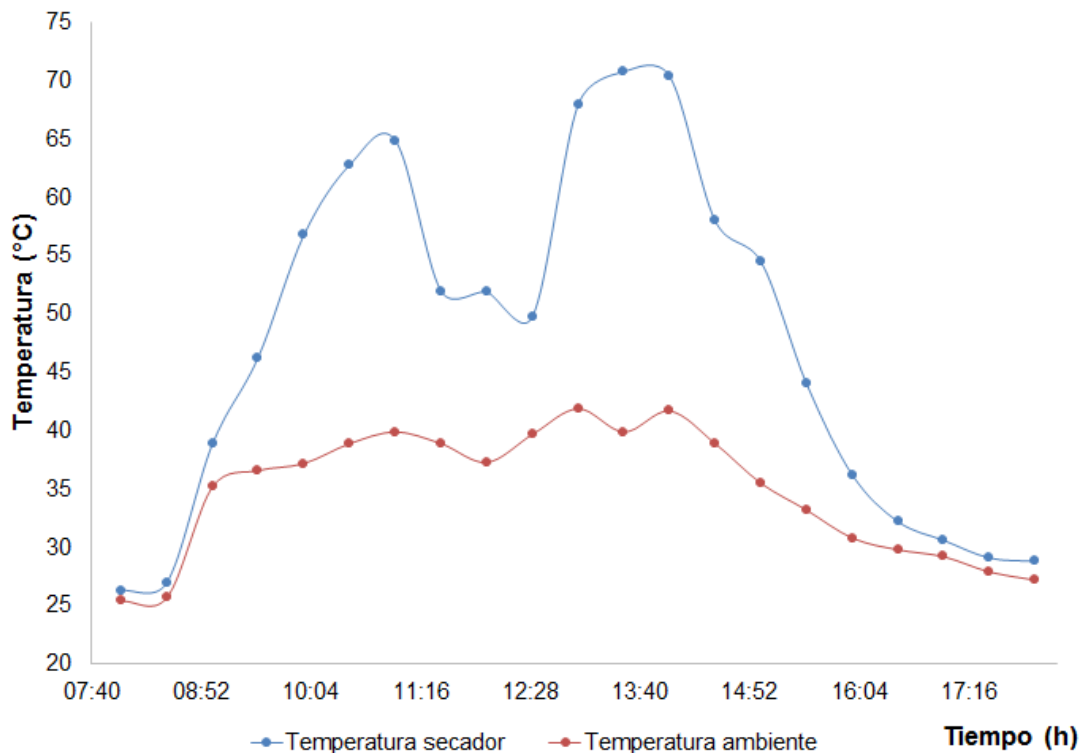


Figura 22. Perfiles de temperatura del secador y del ambiente

Los valores de temperatura alcanzados en la cámara de secado son superiores a los que reportan otros autores. Clodoaldo *et al* en 2008 diseño un secador solar para el secado de plantas medicinales donde obtuvo una temperatura máxima en la cámara de secado de 39.5 °C en contraste con 69.7 °C alcanzados por el secador diseñado en este proyecto. Las temperaturas máximas para ambas investigaciones se alcanzaron entre la 1:30pm y 2:00 pm. La hora del día donde se alcanzaron las

temperaturas máximas concuerdan con el estudio de Santo *et al* en 2012, quien también midió la irradiación solar en distintos momentos del día reportando valores máximos de radiación solar de 950 w/m² a las 2 pm.

En el Figura 23 se muestra el comportamiento de la temperatura y del porcentaje de humedad relativa al interior del secador solar con respecto a diferentes instantes horas del día. Claramente se puede observar que a medida que la temperatura va en aumento, en las primeras horas de la mañana, se da progresivamente una disminución en el porcentaje de humedad relativa, esta tendencia favorece el proceso de remoción de agua del producto ya que la transferencia del calor al producto es mayor. En general, se puede deducir que entre las 13:30 y 14:00 pm es el periodo que mejor favorece la transferencia de agua desde el producto hacia el aire, ya que su temperatura es la más alta (en promedio 69.7°C) y su humedad relativa la más baja (10% en promedio). Resultados que son acordes con la teoría, ya que mientras más caliente sea el aire, mayor será la humedad que podrá contener antes de saturarse, de esta forma el aire caliente puede extraer una mayor cantidad de humedad del producto que el aire frío. El factor de arrastre es la capacidad del aire para retirar humedad y fluctúa entre un 30% y 50% de la cantidad teórica (Maupoey et al., 2001).

Otros estudios en secadores solares constatan estos resultados. Fodor en 2010 menciona que en un ambiente nublado con temperaturas alrededor de los 29°C y con una HR del 80%, el proceso de secado podría resultar muy lento, pero si el aire es calentado a 49°C o más como ocurre en la cámara de secado de un secador solar, la HR disminuiría hasta un 28%; permitiendo de esta manera acelerar el proceso de secado. Por otro lado autores como Santo *et al.*, en 2012 también mencionan la importancia de la humedad relativa dentro del secador solar para contribuir a un buen secado del producto.

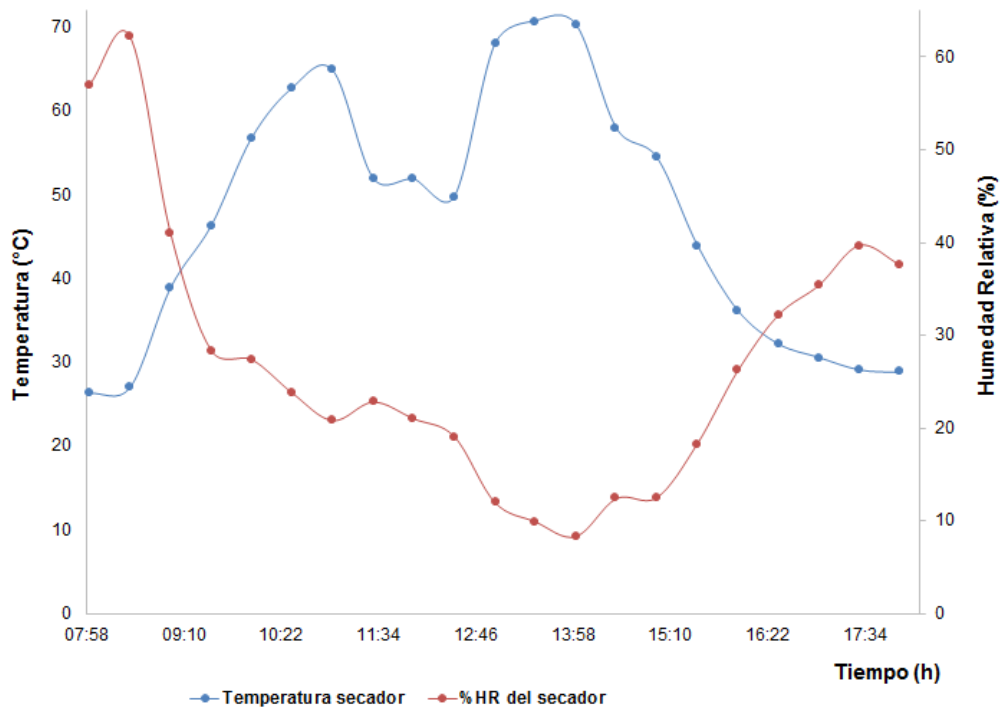


Figura 23. Comportamiento de la temperatura y %HR en relación al interior del secador

En la figura 24 se muestra el comportamiento cinético de la pérdida de humedad libre de la base proteica con respecto al tiempo de secado. En el gráfico se puede evidenciar que el periodo de velocidad constante inicia a la media hora de empezar el proceso de secado y termina a las 1.5 h, tiempo en el cual empieza el periodo de velocidad decreciente. El proceso de secado en este periodo es lento, lográndose llegar a la humedad de equilibrio del producto aproximadamente 7 horas más tarde. Finalmente, fue encontrado que el producto llegó a la humedad de equilibrio ($0.270 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{Kg}_{\text{ss}}$) a las 8 horas de secado a las condiciones climatológicas de la ciudad de Medellín.

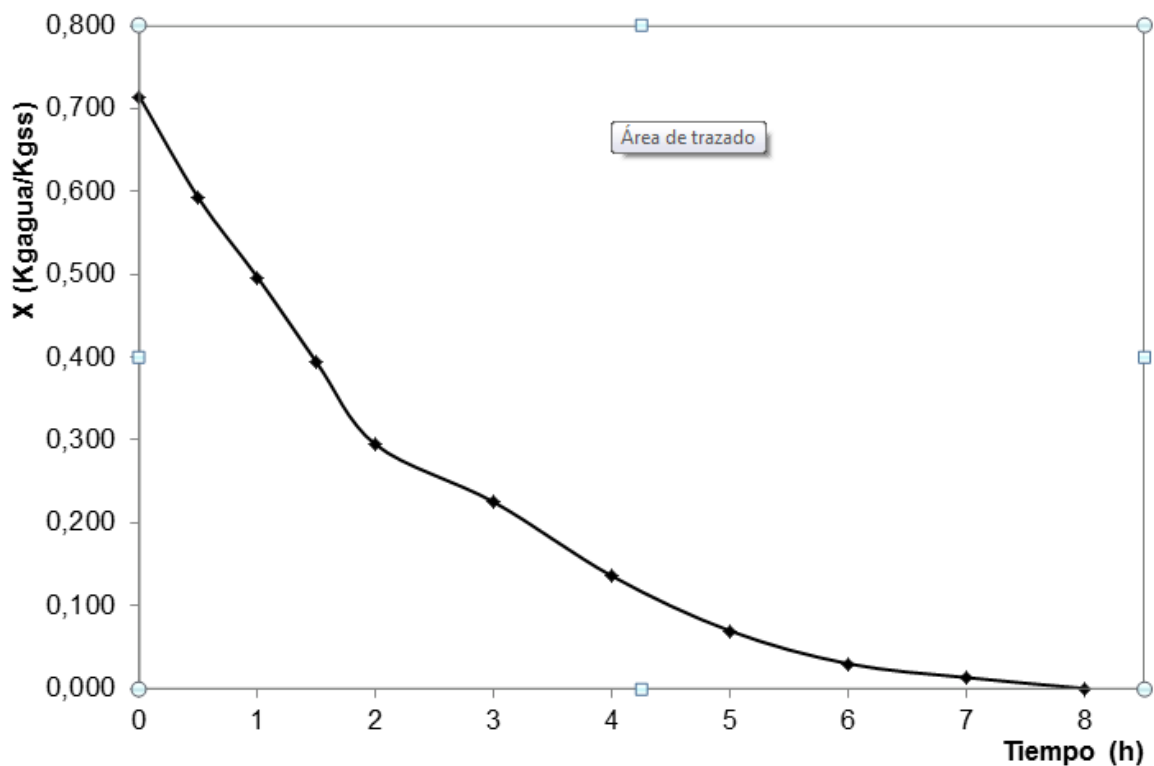


Figura 24. Cinética de secado de la base proteica

En la curva de velocidad de secado (ver figura 25) se puede observar más claramente las diferentes fases del proceso de secado. El periodo inicial del proceso de secado del ensilado químico inicia cuando el producto tiene un delta de humedad libre de $0,653 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{Kg}_{\text{ss}}$, y la velocidad de secado en este punto es de $0,423 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{m}^2\cdot\text{h}$, a partir de este punto se da una disminución rápida de la velocidad de secado hasta llegar a $0,331 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{m}^2\cdot\text{h}$ (R_c), punto donde se da un inicio del periodo de velocidad constante hasta que el producto llega a un contenido en humedad crítica (X_c) de $0,344 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{Kg}_{\text{ss}}$. En este punto crítico se ve claramente un decaimiento drástico en la velocidad de secado desde $0,343$ hasta $0,120 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{m}^2\cdot\text{h}$, momento en el cual la velocidad de secado sigue disminuyendo, hasta que finalmente la base proteica llega a su humedad de equilibrio $0,270 \text{ Kg}_{\text{agua}}/\text{Kg}_{\text{ss}}$.

La curva de velocidad de secado de la base proteica muestra una tendencia característica, la cual concuerda con otros trabajos donde se diseñaron prototipos de secadores solares para deshidratar vegetales (Morales, 2009).

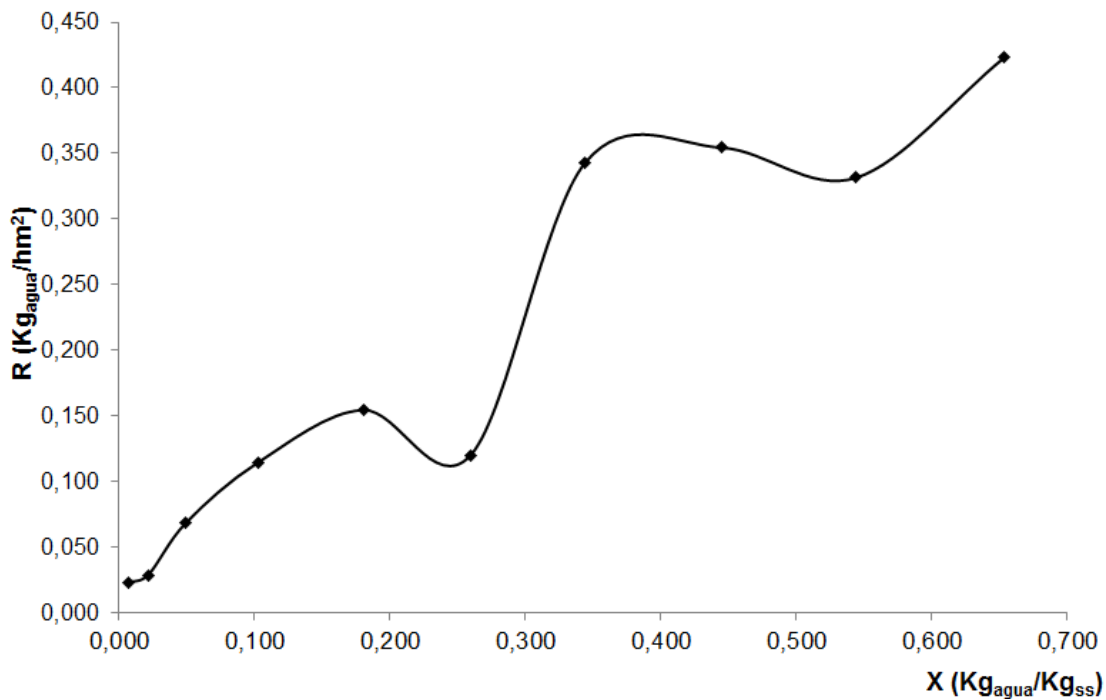


Figura 25. Curva de velocidad de secado versus humedad libre de la base proteica. Con el fin de validar el secado solar de la base proteica, se decidió realizar un segundo secado. En la figura 26 se presenta la gráfica del perfil de temperatura dentro del secador para el secado 1 y el secado 2.

En la figura 26 puede observarse un perfil de temperaturas al interior del secador similares tanto en el secado 1 como el secado 2, sin embargo la temperatura máxima lograda para el secado 1 fue 69.7°C a las 14:00 pm, en contraste con 64,2°C a las 14:30 pm para el secado 2, al comparar ambas curvas también se puede observar que en promedio la temperatura del secado 2 siempre fue menor que la del secado 1, siendo la temperatura claramente influenciada por las condiciones del día en las cuales fueron realizados ambos secados.

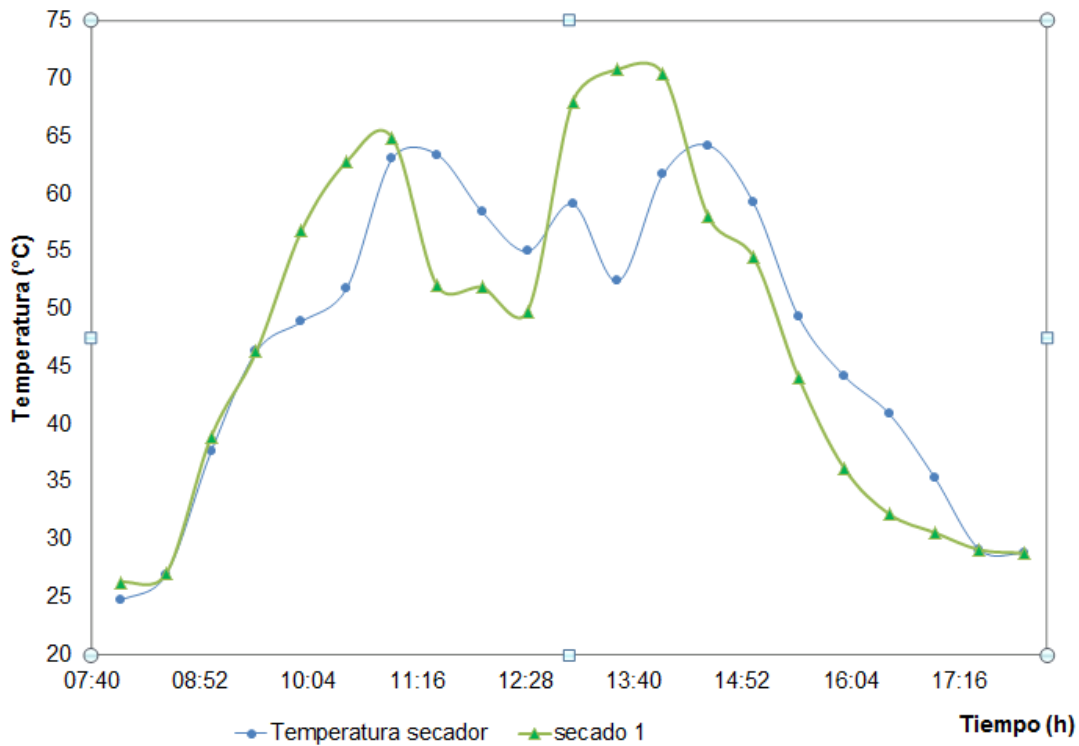


Figura 26. Comportamiento de la temperatura dentro del secador para el secado 1 y el secado 2.

En la figura 27 se puede observar el grafico de la perdida de humedad para ambos secados, se puede ver que la pendiente es mayor para el secado 1, este presenta una temperatura promedio más alta durante la mayor parte del día, es por esto que si se tienen unas condiciones climáticas adecuadas, como lo son la ausencia de lluvia y baja nubosidad se puede lograr un secado más rápido.

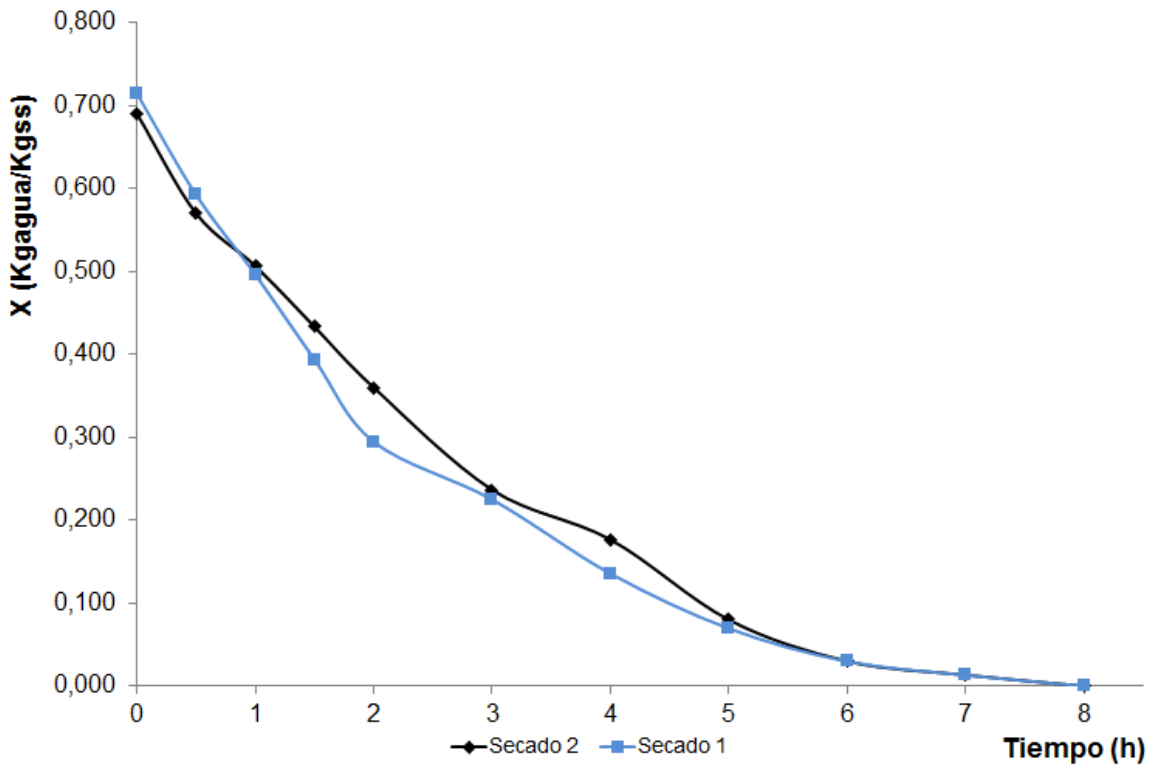


Figura 27. Cinética del secado 1 y secado 2 para la base proteica.

También cabe mencionar que al finalizar las 8 horas de secado se procedió a realizar la humedad en ambos secados, arrojando para el secado 1 un valor de 11.61 ± 0.15 % en comparación con el secado 2 el cual arrojó un porcentaje de humedad de 17.41 ± 0.43 %, esta última es una humedad muy alta para el almacenamiento de la base proteica por lo cual se debe someter a otro día más de secado, en este trabajo se alcanzó la humedad deseada en pocos días de secado, similar a lo que ocurre con otros trabajos como el de Oliveros *et al* en 2006 el cual tardo 3 días para lograr la humedad deseada en café.

En la Tabla 14 se presenta la caracterización fisicoquímica de la base proteica después del proceso de secado.

Tabla 14. Composición fisicoquímica y pH de la base proteica después del proceso de secado

| | %Humedad media ± DE | %Proteína media ±DE | % Grasa media ± DE | %Cenizas media ± DE | pH |
|---------|------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------|
| Base | | | | | |
| Humedad | 11.61±0.15 | 19,51±0.05 | 30,218±1.6 | 1,96±0.04 | 3.51±0.23 |

El contenido proximal de esta base lipo-proteica fueron similares a los resultados reportados por Goddard *et al* en 2005, sin embargo otros autores reportan contenidos más altos principalmente en proteína (Belli Contreras, 2009; Goddard *et al.*, 2001), esto se puede deber ya que el contenido nutricional de los ensilados pueden variar de acuerdo al tipo de subproducto pesquero utilizado, especie de pescado, época del año, tipo de alimentación, grado de maduración gonadal y sexo (Borghesi *et al.*, 2008). También cabe resaltar que la materia prima en este estudio estuvo compuesta solo por vísceras de cachama blanca las cuales tienen un menor contenido de proteína que cuando se elaboran ensilados con pescado entero. El pH encontrado para la base proteica fue de 3.51, al ser este valor menor a 4 contribuirá a detener la actividad de microorganismos que puedan dar origen a la descomposición de esta materia prima misma (Vidotti *et al.*, 2003)

También es importante resaltar que aunque el porcentaje de proteína en esta investigación no puede reemplazar totalmente la utilización de la harina de pescado como ha sucedido en otras investigaciones (Llanes *et al.*, 2010), si puede sustituir parcialmente este producto tal y como se ha reportado por Lessi en 1995 al incorporarlo en raciones para animales junto a otras materias primas.

Cuando se revisa las formulaciones para alimentar animales, para este caso la formula balanceada para alimentar trucha de la empresa Nicovita, se puede observar que la formulación de esta empresa tiene un contenido de proteína de 40%, grasa de 15% y 12 % de humedad, se puede observar que la base proteica obtenida en este proyecto tiene un porcentaje de humedad similar 11.61 ± 0.15 , en el caso de la proteína $19,51 \pm 0.05$ sería necesario adicionarla con más proteína para cumplir con los requerimientos necesarios en este tipo de alimentación.

Tabla 15. Composición microbiológica de la base proteica después del proceso de secado

| Recuento mesófilos aerobios UFC/g | Recuento Hongos levaduras UFC/g | Coliformes totales NMP/g | Coliformes fecales NMP/g | Salmonella sp presencia o ausencia |
|--|--|---------------------------------|---------------------------------|---|
| <10 | <10 | <3 | <3 | Ausencia |

Tal como se puede ver en la Tabla 15 los recuentos microbianos de patógenos en la base proteica son inhibidos, principalmente por la acidez de los ensilados, cabe resaltar que es necesario controlar el nivel microbiológico, principalmente de microorganismos como coliformes y salmonellas, y de este modo asegurar una materia prima con condiciones óptimas para su uso en la alimentación animal (Fernandez Herrero *et al.*, 2013). Cabe resaltar la importancia de tener una carga microbiana baja, ya que si no es así la base proteica representaría un riesgo para la salud de los animales. Es por esto que cada vez más se establecen controles y normas estrictas para evitar y controlar la presencia de estos microorganismos (ICA, 1999).

Una vez obtenida esta base proteica se realizó la prueba de bases volátiles totales, estas incluyen: la trimetilamina la cual se forma gracias al deterioro microbiano,

dimetilamina producida por enzimas autolíticas durante el almacenamiento y amoniaco. El valor reportado para esta base proteica fue de 83.41 mg N/100g, este valor es similar al permitido para conservas de pescado reportado en la norma CE 2074/2005 el cual establece 70 mg N/100g.

La Inhibición en la formación de estas aminos se debió a que la base proteica fue realizada con el ensilaje óptimo, el cual no presento conteos en los microorganismos evaluados, siendo estos uno de los causantes en la formación de estas bases volátiles (Dapkevicius *et al.*, 2000).

Tal y como se pudo observar en los resultados anteriores se puede decir que el proceso de secado de alimentos es una operación unitaria que favorece el almacenamiento y la conservación fisicoquímica y microbiológica del producto, resaltando que al utilizar un secador solar para dicho proceso se evita que el producto se contamine con materiales extraños tales como polvos, y también se previene que esté expuesto a las aves, insectos y roedores.

El uso de un sistema de aprovechamiento de energía solar también demostró ser un proceso eficiente para el secado de la base proteica ya que de acuerdo a los resultados de la cinética de deshidratación del producto, en un periodo de 8 h se redujo el contenido de humedad de la base proteica desde una humedad inicial de $48.85 \pm 0.21\%$ hasta una final de $11.6 \pm 0.15\%$. Es importante señalar que en ensayos previos se realizó el secado del ensilado líquido y se obtuvo un producto con una textura pegajosa y difícil de manipular, por tal motivo, se decidió realizar una mezcla de ensilado con harina de trigo (base energetica) con el fin de facilitar la manipulación del producto. Los resultados en este estudio concuerdan con los encontrados por (Goddard *et al.*, 2001), quienes concluyen que al adicionar cereales al ensilado se disminuyen los tiempos de secado, la textura del producto es más suave y es más fácil ajustar los requerimientos nutricionales en una formulación específica. Del mismo modo, Ali *et al* en 1994 demostraron que mezclas de ensilado con salvado de trigo, sometidos a secado solar, tienen un alto valor nutricional comparable con la harina de pescado utilizada en alimentos acuícolas. La base

proteica obtenida en este estudio se presenta como una alternativa de fácil elaboración y con propiedades nutricionales importantes para que los piscicultores lo puedan aprovechar en la alimentación de otras especies animales. Adicionalmente, se puede concluir que el proceso de secado solar ofrece otras ventajas en cuanto a su utilización, tales como: costos moderados de construcción y tecnología accesible para los piscicultores.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a partir del diseño experimental aplicado para el proceso de ensilaje biológico, en el cual se utilizó el microorganismo *L. plantarum*, permite concluir que las condiciones óptimas para maximizar la producción de ácido láctico y minimizar los recuentos microbianos fueron: inóculo (3.01%), melaza (11.69 %) y suero lácteo (0.38%). A estas condiciones se logró obtener un ensilado con un porcentaje de ácido láctico de 4.3% y recuentos de mohos y levaduras de <10 UFC/g y 23 NMP/g de coliformes totales.

Para el ensilaje químico las concentraciones óptimas de ácido fórmico (2%) y ácido sulfúrico (1%) permitieron obtener un producto estable debido a que los recuentos microbianos fueron minimizados, encontrándose los siguientes resultados en la validación experimental: mesófilos aerobios <10UFC/g, mohos y levaduras <10UFC/g, coliformes totales y fecales <3NMP/g.

Es posible obtener un escalado del ensilaje químico óptimo en recipientes de 7 kg con bajos recuentos microbianos tal y como sucedió con el mismo optimizado sin escalar.

La base lipo-proteica elaborada a partir del ensilaje químico optimizado, es una buena materia prima para la elaboración de raciones alimenticias de animales, gracias a su contenido de proteínas 19.51%, también resaltando que la obtención de esta requiere una baja inversión de capital y no se requiere consumo de energía gracias al proceso de secado solar.

Se recomienda el uso de un secador solar para la eliminación de la humedad, ya que el desarrollado en este proyecto logro obtener un base proteica con un porcentaje de humedad de 11.61% en 8 horas de secado.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Considerando el buen comportamiento del secador solar utilizado, se podría incorporar a este un sistema de acumulación de calor durante el día, para ser entregado en horas de la noche y de este modo el alimento pueda continuar su proceso de secado aun en ausencia de sol.

Se requiere continuar desarrollando trabajos de investigación donde se elabore alimentación para peces partiendo de la base de los ensilados optimizados y de la base proteica desarrollada en esta investigación.

Se recomienda realizar estudios de vida útil a la base proteica obtenida y de este modo determinar cuáles serían las mejores condiciones para su almacenamiento y cuánto tiempo conservan su calidad fisicoquímica y microbiológica.

Se recomienda realizar una caracterización de aminoácidos presentes en la base proteica para poder definir cuáles serían los peces que cumplan con esta necesidad de aminoácidos.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOAC 920.39, A. (2003). Dietileter, Extracto Etereo. Retrieved April 29, 2015, from <http://es.scribd.com/doc/128237003/Aoac-920-39-2003-05-Extracto-Etereo-Dietileter#scribd>
- Ahmed, J., & Mahendrakar, N. S. (1996). Acceleration of fish viscera silage by prefermented starter culture. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 171–177.
- Ali, M.Z., Gheyasuddin, S., Zaher, S., Hossain, M.A., Islam, M. . (1994). Evaluation of fish silage from underutilized marine fishes as protein sources in the diet of major carp. *J. Aqua Trop*, 8, 247–254.
- Almada, M., Stella, M., Machaín-Singer, M., y Pulfer, J. (2005). Guía de uso de secadores para frutas, legumbres, hortalizas, plantas medicinales y carnes.
- AOAC 942.05. Determination of ash in animal feed: AOAC official method 942.05 revisited. *Journal of AOAC International*, 95(5), 1392–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23175971>
- AOAC 954.01. (n.d.). Protein (Crude) in animal feed and pet food. Kjeldahl.
- Arellano Arriaga, A. (2013). Evaluación del proceso de obtención y separación de ácido láctico a partir de la fermentación de suero lácteo mediante tecnología de membrana.
- Association of official analytical chemists, Official methods of analysis, 1980, Horwitz, W. . W. (n.d.). No Title.
- Axelsson, L. (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, Third Edition*. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=P0p5_uXL9uQC&pgis=1
- Balsinde Ruano, M. D. P. B., Fraga Castro, I., & Galindo López, J. (2003). Inclusión de ensilado de pescado como alternativa en la elaboración de alimento extruido para el camarón de cultivo (*Litopenaeus schmitti*). *Centro de Investigaciones Pesqueras*, 2003(1), 303–309.
- Barrero Lopera, N. M. (2007). *Evaluación organoléptica, química y degradabilidad de ensilajes de vísceras de pescado y harina de leucaena suplementadas con fuentes energéticas en bovinos*.

- Belén-Camacho, D. R., Román, J. C., Pantaleón, D. G., Moreno-Álvarez, M. J., Martínez, C. M., & Escalona, C. E. O. (2007). EFECTO DEL SECADO SOLAR EN LOS CONTENIDOS DE HUMEDAD, CARBOHIDRATOS, CAROTENOIDES TOTALES E ÍNDICE DE.
- Belli Contreras, J. E. (2009). *Estabilidad aeróbica y día óptimo de uso del ensilado biológico de pescado para la alimentación animal.*
- Bello Gil, Daniel; Carrera Bocourt, Emilia; Díaz Maqueira, Y. (2006). Determinación de azúcares reductores totales en jugos mezclados de caña de azúcar utilizando el método del ácido 3,5 dinitrosalicílico.
- Bello, R. A. (1997). Experiencias con ensilado de pescado en Venezuela. *FAO ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH PAPER*, 1–14.
- Bermudez, Julio E Jairo H Rodriguez, A. O. y L. P. (1999). Ensilaje de vísceras de pescado Cachama blanca (*Piaractus brachyponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos de engorde en una dieta con aceite crudo de palma (*Elaeis guineensis* - *Elaeis oleifera*). Retrieved May 12, 2015, from <http://www.lrrd.org/lrrd11/2/ocam112.htm>
- Borghesi, R. (2004). AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA , NUTRICIONAL E BIOLÓGICA ELABORADAS COM DESCARTE E RESÍDUO DO BENEFICIAMENTO DA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) Estado de São Paulo - Brasil DAS SILAGENS ÁCIDA , BIOLÓGICA E ENZIMÁTICA ELABORADAS COM DESCARTE E RESÍDUO.
- Borghesi, R., Arruda, lia F. de, & Oetterer, M. (2008). A silagem de pescado na alimentação de organismos aquáticos. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 25(2). <http://doi.org/10.5380/cep.v25i2.10643>
- Brenndorfer, B., Kennedy, L., & Mrema, G. C. (1987). *Solar Dryers: Their Role in Post-harvest Processing.* Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=x77Ts_cB5CMC&pgis=1
- Cira, L. A., Huerta, S., Hall, G. M., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359–1366. [http://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00008-0](http://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00008-0)
- Clodoaldo Sivipaucar, Herve Curo, Eder Huancahuari, Víctor Llantoy, & A. V. (2008). Cálculo Y Construcción De Un Secador Solar Por Convección Natural Para El Secado De Plantas Medicinales No Tradicionales Calculation and Construction of a Solar Dryer By Natural Convection for Drying of Non-Traditional Medicinal Plants. *Revista de Investigación CEDIT*, 18–30.

- DANE. (2010). Encuesta nacional agropecuaria .
- Dapkevicius, M. L. N. E., Nout, M. J. R., Rombouts, F. M., Houben, J. H., & Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 57(1-2), 107–114. [http://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00238-5](http://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00238-5)
- Departamento de inmunología, microbiología y parasitología. (2013). Cinética de la fase exponencial de la curva de crecimiento microbiano. Retrieved April 13, 2015, from <http://testak.org/microbiologia/crecimiento/cinetica.pdf>
- Díaz Ríos, H. L. (2004). Efecto de la suplementación con ensilaje de residuos de una planta procesadora de tilapia (*Oreochromis niloticus*) sobre el consumo voluntario y la digestibilidad de nutrientes de heno de gramíneas y leguminosas tropicales.
- Duarte Torres, A. (1998). *Introducción a la ingeniería bioquímica*.
- Erika Esperanza Fajardo Castillo, S. C. S. F. (2007). Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae*, 24–25.
- Fagbenro, O., & 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(1), 29–35. [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)00064-8](http://doi.org/10.1016/0960-8524(94)00064-8)
- Fao. (1992). *Trabajos presentados en la segunda consulta de expertos sobre tecnología de productos pesqueros en América Latina: Montevideo, 11-15 de Diciembre de 1989*. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=7eSHJ_dBJxYC&pgis=1
- FAO. (2010). *Evaluación y aprovechamiento de la cachama cultivada, como fuente de alimento*. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab494s/AB494S04.htm>
- Fernandez Herrero, A. L., Tabera, A., Agueria, D., & Manca, E. (2013). OBTENCIÓN , CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA Y FÍSICO-
- Figuroa, V. (1997). *Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal: Memorias de un taller regional organizado por el Instituto de Investigaciones Porcinas (IIP) y la FAO, en La Habana, Cuba, del 5 al 8 de septiembre d* (Vol. 134). Food & Agriculture Org.
- Fodor, E. (2010). The solar food dryer. *New Society Publisher*.

- Fu, W., & Mathews, a. P. (1999a). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), 163–170. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00014-5](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00014-5)
- Fu, W., & Mathews, A. P. (1999b). Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, 3(3), 163–170. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(99\)00014-5](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(99)00014-5)
- Galleguillos, M. (2011). control de calidad de insumos y dietas acuícolas. Retrieved May 29, 2015, from <http://www.fao.org/docrep/field/003/ab482s/AB482S22.htm>
- García, O., Pons, I. A., Mora, J. A., Sánchez, A., & Rodríguez, H. (2009). Evaluación física y proximal de la carne para hamburguesas elaborada a partir de pulpa de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) con harina de soya texturizada. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(4), 951–962.
- García Ramos, P. A. (2011). *Elaboración de ensilado de pescado de la fauna de acompañamiento de la pesca artesanal del litoral pacífico guatemala usando diferentes medios para su acidificación. Facultad De Medicina Veterinaria Y Zootecnia. Vetzoo.Umich.Mx.* Retrieved from <http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2008/Febrero/prevencion y tratamiento del distemper canino.pdf>
- Geankoplis, christie j. (1998). Procesos de transporte y operaciones unitarias. Retrieved May 28, 2015, from <http://es.slideshare.net/RagurtoIAgurtoLaban/procesos-de-transporte-y-operaciones-unitariaschristie-j-geankoplis>
- Georgieva, R., Koleva, P., Nikolova, D., Yankov, D., & Danova, S. (2014). Growth Parameters of Probiotic Strain *Lactobacillus Plantarum* , Isolated from Traditional White Cheese. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 861–865. <http://doi.org/10.1080/13102818.2009.10818558>
- Gilbert, E. R., Wong, E. A., & Webb, K. E. (2008). Board-invited review: Peptide absorption and utilization: Implications for animal nutrition and health. *Journal of Animal Science*, 86(9), 2135–55. <http://doi.org/10.2527/jas.2007-0826>
- Goddard, J. S., & Al-Yahyai, D. S. S. (2001). Chemical and Nutritional Characteristics of Dried Sardine Silage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 10(4), 39–50. http://doi.org/10.1300/J030v10n04_04

- Goddard, J. S., & Perret, J. S. M. (2005). Co-drying fish silage for use in aquafeeds. *Animal Feed Science and Technology*, 118(3-4), 337–342. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.11.004>
- Góngora, H. G., Ledesma, P., Valvo, V. R. Lo, Ruiz, A. E., & Breccia, J. D. (2012). Screening of lactic acid bacteria for fermentation of minced wastes of Argentinean hake (*Merluccius hubbsi*). *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 767–772. <http://doi.org/10.1016/j.fbp.2012.04.002>
- González, A., Márquez, A., Senior, W., & Martínez, G. (2007). Constituyentes minerales del morocoto *Piaractus Brachypomus* en el Orinoco Medio de Venezuela. *Rev. Cient*, 17(4), 325–329.
- Goosen, N. J., de Wet, L. F., Görgens, J. F., Jacobs, K., & de Bruyn, A. (2014). Fish silage oil from rainbow trout processing waste as alternative to conventional fish oil in formulated diets for Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Animal Feed Science and Technology*, 188, 74–84. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2013.10.019>
- Holguin, M., Caicedo, L., & Veloza, L. (2009). Biológicos a Partir De Residuos De Pescado Inoculados Con Bacterias Ácido-Lácticas. *Revista Médica Veterinaria*, 56, 95–104.
- ICA. (1999). Directivas técnicas alimentos para animales y sales mineralizadas.
- Icontec. (2009). Método horizontal para detección y enumeración de coliformes técnica del número más probable, (571), 1 – 11.
- Jahn B., E., Soto O., P., Cofré B., P., & Sasmay M., R. (2003). VELOCIDAD DE SECADO DE ALFALFA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE RADIACIÓN SOLAR Y ANCHO DE HILERADO. *Agricultura Técnica*, 63(1), 30–37. <http://doi.org/10.4067/S0365-28072003000100005>
- Jakymec, M., Moran, H., Páez, G., & Ferrer, J. M. Z. (2001). Cinética de la producción de ácido láctico por fermentación sumergida con lactosuero como sustrato. *Revista Científica FCV-LUZ*.
- Je, J.-Y., Qian, Z.-J., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5), 840–846.
- Jeon, Y.-J., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (1999). Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochemistry*, 35(5), 471–478.

- Klomklao, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Chaijan, M. (2011). 24 kDa Trypsin: A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* ?? *Clarias gariepinus*). *Food Chemistry*, 129(3), 739–746. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.014>
- Lessi, E. (1995). Ensilajes de Pescado en Brasil para la Alimentación Animal.
- Liu, J.-Z., Weng, L.-P., Zhang, Q.-L., Xu, H., & Ji, L.-N. (2003). A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 14(2), 137–141. [http://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00169-9](http://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00169-9)
- Llanes, J. E., Bórquez, A., Toledo, J., & de la Vega, J. M. L. (2010). Digestibilidad aparente de los ensilajes de residuos pesqueros en tilapias rojas (*Oreochromis mossambicus* x *O. niloticus*). *Zootec. Trop*, 28, 499505.
- Lo, K. V, Gao, Y., & Liao, P. H. (1992). The stability of silage from fish mortalities. *Biomass and Bioenergy*, 3(5), 357–361. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0961-9534\(92\)90008-E](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/0961-9534(92)90008-E)
- Lozano, F. (2000). Producción masiva en microorganismos biocontroladores. In 1. *Curso Taller Internacional Control Biológico. Santafe de Bogota (Colombia). 15-27 May 2000.*
- Machin, D. H. (1999). El Uso Potencial Del Ensilaje Para La Producción Animal En La Zona Tropical , Especialmente Como Una Opción Para Los Pequeños Campesinos, 73–85.
- Manca, E., & Carrizo, J. C. (2002). Informe final de producción y utilización de ensilados en la formulación de dietas. *Proyecto DNA/INIDEP*, 4961(8).
- Martinez P., R. (2003). Producción de un ensilado biológico a partir de vísceras de pescado de las especies *Prochilodus mariae* (coporo), *Pseudoplatystoma fasciatum* (bagre rayado) y *Phractocephalus hemiliopterus* (cajaro), 32(1), 80. <http://doi.org/10.1024/0301-1526.32.1.54>
- Maupoey, P. F., Grau, A. M. A., Sorolla, A. M. A., & Baviera, J. M. B. (2001). *Introducción al secado de alimentos por aire caliente*. Editorial U.P.V. Retrieved from <https://books.google.com/books?id=cUEt038sq90C&pgis=1>
- Mayer, A. F. (1999). El silaje y los procesos fermentativos.
- Merino, M. C., Bonilla, S. P., & Bages, F. (2013). Diagnóstico del estado de la acuicultura en Colombia. *Plan Nacional de Desarrollo de La Acuicultura*

Sostenible En Colombia AUNAP-FAO. Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura Y Desarrollo Rural.

- Miranda, O. M., Fernández, M. O., & López, M. C. (2010). Ensilaje de pescado a partir de subproducto de la pesca no comerciable. Composición química y pH , (Instituto de Investigaciones Agropecuarias Jorge Dimitrov).
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171–82. <http://doi.org/10.1007/s00394-008-0710-2>
- Montano, A., De Castro, A., & Rejano, L. (1992). Transformaciones bioquímicas durante la fermentación de productos vegetales. *Grasas Y Aceites*, 43(6), 352–360. <http://doi.org/10.3989/gya.1992.v43.i6.1132>
- Mora, J. (2005). Rendimiento de la canal en cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) y el híbrido *Colossoma macropomum* x *P. brachypomus*. Procesamiento primario y productos con valor agregado. *Bioagro*, 17(3), 161–169.
- Mora N., G. a. (2007). Susceptibilidad De Bacterias Ácido Lácticas (Bal) Frente a Diversos. *tESIS*, 127.
- Morales, M. (n.d.). Optimización de un prototipo de secador solar para secado de lúcuma en Ayacucho. 2009.
- Moreno, G. M. (2010). Manual De Construcción Y Operación De Una Secadora Solar, 14.
- Morsetto, J., Lema, A., Pontin, M., & Paisio, G. (2008). Estudio preliminar sobre la cinética de secado para perejil en condiciones de secado solar. *Avances En Energías Renovables Y Medio Ambiente*, 12(8), 141–146.
- Navarro, O. J., Santamaría, Y. V., & Casallas, P. E. C. (2004). Evaluación de cinco protectores para la crioconservación de semen de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 17(4), 53–59.
- Nielsen, J., & Villadsen, J. (1992). Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, 47(17-18), 4225–4270. [http://doi.org/10.1016/0009-2509\(92\)85104-J](http://doi.org/10.1016/0009-2509(92)85104-J)
- Norgaard, J. V., Petersen, J. K., Topping, D. B., Jorgensen, H., & Lærke, H. N. (2015). Chemical composition and standardized ileal digestibility of protein and amino

acids from blue mussel, starfish, and fish silage in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 205, 90–97. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.04.005>

Novoa, D. (2002). Los recursos pesqueros del eje fluvial Orinoco-Apure: presente y futuro. *Ministerio de Agricultura Y Tierra, INAPESCA, Venezuela*.

NTC 4132. (1997). Guia general para el recuento de mohos y levaduras.

NTC 4519. (2009). NTC microbiologia de alimentos para consumo humano.

Obregón, D. A. A. (2006). Estatus actual de la Tilapia Roja en Colombia: Tilapia Roja, una bomba de tiempo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(8), 1–3.

Oliveros Tascon, C. E., Sanz Uribe, J. R., Ramírez Gomez, C. a., & Peñuela Martínez, A. (2006). Secador solar de túnel para café pergamino. *Federación Nacional de Cafeteros de Colombia*.

Ossa, J. A., Vanegas, M. C., Badillo, Á. M., & de Alimentos, L. (2010). EVALUACIÓN DE LA MELAZA DE CAÑA COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE *Lactobacillus plantarum*. *Revista UDC A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(1), 97–104.

Padilla Pérez, P. (1996). Técnica del ensilado biológico de residuos de pescado para ración animal. *Folia Amazónica*, 8(2), 147–151.

Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., & Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105(1), 1–14. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.035>

Parra Huertas, R. A. (2010). Bacterias Ácido Lácticas: papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8, 93–105.

Parra Huertas, R. adolfo. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 8(1), 93–105.

Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44(5), 1276–1283. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.035>

Perez Guedez, N. Q. H. (2014). Efecto del Alimento Artesanal a Base de Ensilado Biológico de Pescado y Harina de Sangre sobre la Ganancia de Peso en Cachama en Fase de Engorde en Pedraza, Estado Barinas. Retrieved May 26,

2015, from
<https://encuentroalimentosbalanceados.wordpress.com/2014/10/08/efecto-del-alimento-artesanal-a-base-de-ensilado-biologico-de-pescado-y-harina-de-sangre-sobre-la-ganacia-de-peso-en-cachama-en-fase-de-engorde-en-pedraza-estado-barinas/>

Piqueras, V. Y. (2015). » ¿Qué es la metodología de la superficie de respuesta? Retrieved May 20, 2015, from <http://victoryepes.blogs.upv.es/2013/05/09/que-es-la-metodologia-de-las-superficies-de-respuesta/>

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. a. (1999). Crecimiento microbiano. *Microbiología, 4a Edición*, 115–136.

Rai, A. K., Swapna, H. C., Bhaskar, N., Halami, P. M., & Sachindra, N. M. (2010). Effect of fermentation ensilaging on recovery of oil from fresh water fish viscera. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), 9–13. <http://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.09.007>

Recursos, S. de informacion de los. (2000). Volver a: Suplementación proteica y con NNP (pp. 1–3).

Rojas, M. (2010). Uso de la melaza en la alimentación de ovinos. *Fortalecimiento Del Sistema Producto Ovinos*.

Rosa Montepeque, M. (1996). *deshidratacion de la fauna acompañante por secado solar.pdf*.

Salvucci, E. (2010). Crecimiento microbiano.

Santana-Delgado, H., Avila, E., & Sotelo, A. (2008). Preparation of silage from Spanish mackerel (*Scomberomorus maculatus*) and its evaluation in broiler diets. *Animal Feed Science and Technology*, 141(1-2), 129–140. <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.023>

Santo, A. V., Camilo, O. V., Iñaki, R., Cruz, D. La, & Gerardo, I. (2012). Diseño y construcción de un secador solar portátil, (2), 1613–1618.

Spanopoulos-Hernandez, M., Ponce-Palafox, J. T., Barba-Quintero, G., Ruelas-Inzunza, J. R., Tiznado-Contreras, M. R., Hernández-González, C., & Shirai, K. (2010). Producción de ensilados biológicos a partir de desechos de pescado, del ahumado de atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*) y del fileteado de tilapia (*Oreochromis sp*), para la alimentación de especies acuícolas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(2), 167–178.

- Suárez Zuluaga, A. D., & Escobar, V. V. (2007). Evaluación y simulación de la producción de ácido láctico con *Lactobacillus Casei* ATCC 7469.
- Tapia Salazar, M. (2000). Efecto de las aminos biogenicas presentes en harinas de pescado o suplementadas en la dieta de camaron azul *litopenaeus styurostws*, 4682.
- Toledo, J., & Llanes, J. (2006). Estudio comparativo de los residuos de pescado ensilados por vías bioquímica y biológica Introducción Materiales y Métodos Resultados y Discusión. *Revista AquaTIC*, 25, 28–33.
- Toledo Pérez, J., Botello León, A., & Llanes Iglesias, J. E. (2010). Evaluación del ensilado químico de pescado en la alimentación de. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 1695, 7504.
- Trubey, K. R., Culpepper, S., Maruyama, Y., Kinnamon, S. C., Program, N., & Collins, F. (2006). Evaluacion morfometrica de 3 poblaciones de diferentes edades de cachama blanca "*Piaractus brachypomus*." *American Journal Of Physiology*, (305). <http://doi.org/10.1152/ajpcell.00303.2005>
- Valdez-Fragoso, A., Martínez-Monteagudo, S. I., Salais-Fierro, F., Welti-Chanes, J., & Mújica-Paz, H. (2007). Vacuum pulse-assisted pickling whole jalapeño pepper optimization. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1261–1268.
- Valencia, T. (2010). Disección de un pez óseo. Retrieved June 17, 2015, from http://www.mclibre.org/otros/daniel_tomas/laboratorio/Pez/pez.html
- Vidotti, R. M., Viegas, E. M. M., & Carneiro, D. J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, 105(1-4), 199–204. [http://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00056-7](http://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00056-7)
- Wicki, G., Merino, O. G., Caló, P., & Sal, F. (2012). Use of High Content Fish Silage Wet Food in Final Growth out of Pacú (*Piaractus mesopotamicus* , Holmberg 1887) in Northeast. *Journal of Agricultural Sciense and Technology*, 2, 307–311.
- Wilches López, L. V. (2013). *Crecimiento del microorganismo probiótico*. Universidad de Antioquia.
- Ximenes, C. A. (2008). Técnica del ensilado biológico de residuo de pescado para ración animal. *Lima (Perú)*.

