

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL



**“OBTENCION DE UN ENSILADO BIOLÓGICO A PARTIR DE RESIDUOS
DE TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*)”**

TESIS

PRESENTADA POR:

MARISOL CHURACUTIPA MAMANI

PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

PUNO – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL

“OBTENCION DE UN ENSILADO BIOLÓGICO A PARTIR DE
RESIDUOS DE TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*).”

TESIS



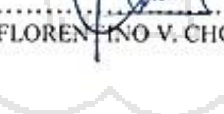


PRESENTADA POR:

MARISOL CHURACUTIPA MAMANI

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE	:	
		Ing. M.Sc. PABLO FARFHUARCAYA	
PRIMER MIEMBRO	:	
		Ing. M.Sc FLORENTINO V. CHOQUEHUANCA CACERES	
SEGUNDO MIEMBRO	:	
		Ing. M.Sc ROGER SEGURA PEÑA	
DIRECTOR DE TESIS	:	
		Ing. YAIRE ROENEL GUERRA LIMA	
ASESOR DE TESIS	:	
		Dr. MARCELINO JORGE ARANIBAR ARANIBAR	

PUNO – PERÚ

2016

Área: Ingeniería y tecnología

Tema: Desarrollo de procesos y productos agroindustriales sostenibles y eficientes

DEDICATORIA

En memoria a mi madre, que desde la eternidad me sigue guiando por el camino de bien. Festejando mis logros y acompañándome en los momentos difíciles.

A Hervert Q. por ser una persona tan especial a quien agradezco por su apoyo incondicional que me ha brindado en cada momento.

A mis hermanos: Efraín, Wilber, Lucila y Marco Antonio (Mis mejores amigos), quienes me apoyaron y confiaron en mí en todo momento.

A la memoria de mis Abuelos (Julio y Estefa) y a mi tío Zacarías, por sus enseñanzas y su inmensa comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A la UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO, FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIA, ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AGROINDUSTRIAL; Por contribuir al desarrollo humano, social y científico de quienes conformamos esta casa de estudios.

A los Docentes de la Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por haberme compartido sus sabias enseñanzas en mi formación profesional.

Gracias al financiamiento de INNOVATE PERU-FINCYT, A la Empresa ARAPA SAN PEDRO Y SAN PABLO S.A.C. y al INTITUTO TECNOLOGICO DE LA PRODUCCION (ITP)- LIMA. En especial al Rvdo.: Padre Marcos DEGEN DUBLIN, Ing. Fredy HILACONDO REYNA, Ing., ALBERTO SALAS, Ing. Maritza BARRIGA SANCHEZ, y a todo el equipo técnico quienes conforman el proyecto: "Implementación de una técnica de ensilado biológico en los residuos crudos de trucha como insumo para la elaboración de dietas balanceadas de alta digestibilidad y de bajo costo para la alimentación de ganado en Puno".

A mis hermanos por haberme orientado durante toda mi vida, y no desistir y a seguir luchando cada día para mejorar y ser alguien en la vida.

A mis jurados, Ing. M.Sc. Pablo PARI HUANCAYA, Ing. M.Sc Florentino V. CHOQUEHUANCA C. Por haberme apoyado en la ejecución de este proyecto y dedicarle un poco de su tiempo en la realización de este.

A mi director, Ing. Saire Roenfi Guerra Lima y la Ing. Maritza Barriga Sánchez, por su apoyo y su paciencia que me tuvo en todo momento para la realización de este proyecto.

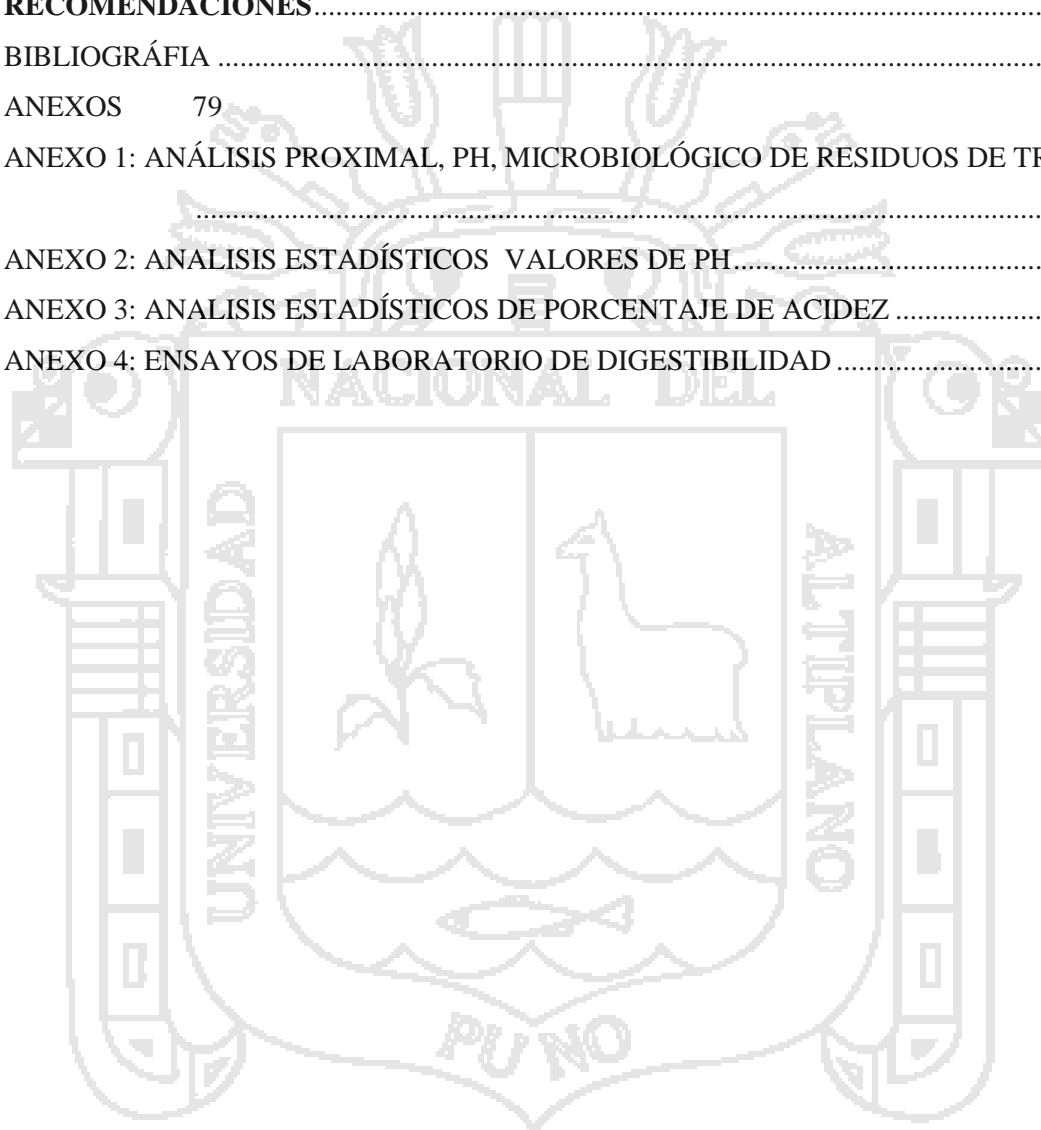
A mis mejores amigos Libia G. Antallaca Cruz, Jhyno Rodríguez Mena, Paul Plinio Montufar y a Cristian Castro N. quienes siempre estuvieron alentándome y apoyándome durante mi vida en la Universidad.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	3
1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.2.1 Objetivo General.....	5
1.2.2 Objetivos Específicos	5
MARCO TEÓRICO.....	6
2.1 MARCO TEORICO.....	6
2.1.1 SUMINISTRO MUNDIAL DE PESCADO	6
2.1.2 PROYECCIONES DE LA PESCA Y ACUICULTURA MUNDIAL.....	6
2.1.3 EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA TRUCHA EN PERÚ.....	7
2.1.4 EMPRESAS CONSTITUIDAS A LA PRODUCCIÓN DE TRUCHA EN PUNO.....	7
2.1.5 PRODUCCION DE TRUCHA EN LAS PROVINCIA DE PUNO.....	8
2.1.6 PRODUCCIÓN DE TRUCHA Y VÍSCERAS EN LA REGIÓN DE PUNO	8
2.2 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	9
2.2.1 ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.....	9
2.2.2 CLASES DE CONTAMINACIÓN	10
2.2.2.1 Contaminación del aire	10
2.2.2.2 Contaminación del suelo.....	10
2.2.2.3 Contaminación del agua.....	10
2.2.3 TIPOS DE CONTAMINANTES	11
2.2.4 FUENTES DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS	11
2.2.4.1 ACTIVIDAD AGROPECUARIA	11
2.2.4.1.1 Subproducto de origen animal	12
2.2.4.2 ACTIVIDAD AGROINDUSTRIAL	12
2.2.4.3 INDUSTRIA DE LA PESCA	12
2.2.4.3.1 Vísceras	13
2.2.4.3.2 Colas y Aletas	13
2.2.4.3.3 Cabezas y espinas	13
2.3 ENSILAJE	13
2.3.1 PROCESO DE ENSILAJE	14
2.3.2 ENSILADO.....	14
2.3.2.1 ENSILADO QUÍMICO	16
2.3.2.2 ENSILADO BIOLÓGICO	17
2.3.2.2.1 Procesos de acidificación y de hidrólisis	19
2.3.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DE ENSILADO	24
2.3.4 VENTAJAS DEL ENSILADO BIOLÓGICO	25
2.3.5 COMPARACIÓN DE ENSILADO Y HARINA DE PESCADO	26

2.3.6 USO DE ENSILADO	27
MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN	30
3.1 MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN	30
3.1.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	30
3.1.2 ANÁLISIS QUÍMICO	30
3.1.2.1 Composición Proximal	30
3.1.2.2 pH	30
3.1.2.3 Acidez	30
3.1.2.4 Histamina	31
3.1.3 ANÁLISIS SENSORIAL	31
3.2 ANALISIS ESTADÍSTICO	31
3.3 PREPARACIÓN DE INOCULO	32
3.3.1 CRECIMIENTO DEL KOJI	32
3.3.1.1 Ta: CEBADA	32
3.3.1.2 Tb: PAPA	33
3.3.1.3 Tc: ARROZ	34
3.4 ELABORACIÓN DE ENSILADO	35
3.4.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE ELABORACIÓN DE ENSILADO BIOLÓGICO	35
3.4.2 MATERIA PRIMA	35
3.4.3 RECOLECCIÓN	36
3.4.4 MOLIENDA	36
3.4.5 FORMULACION DE LA MEZCLA	37
3.4.6 MEZCLADO	37
3.4.7 FERMENTACION	38
3.4.8 ENVASADO	39
3.4.9 ALMACENAMIENTO	39
3.4.10 VIDA ÚTIL	39
ÁREA DE INVESTIGACIÓN	42
4.1 LUGAR DE EJECUCIÓN	42
4.2 MATERIAL Y EQUIPOS	43
4.2.1 MATERIAL EXPERIMENTAL	43
4.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO	43
4.2.3 REACTIVOS	45
ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION	46
5.1 CRECIMIENTO DE <i>ASPERGILLUS ORIZAE</i>	46
5.2 FORMULACIONES DE ENSILADO BIOLÓGICO	49

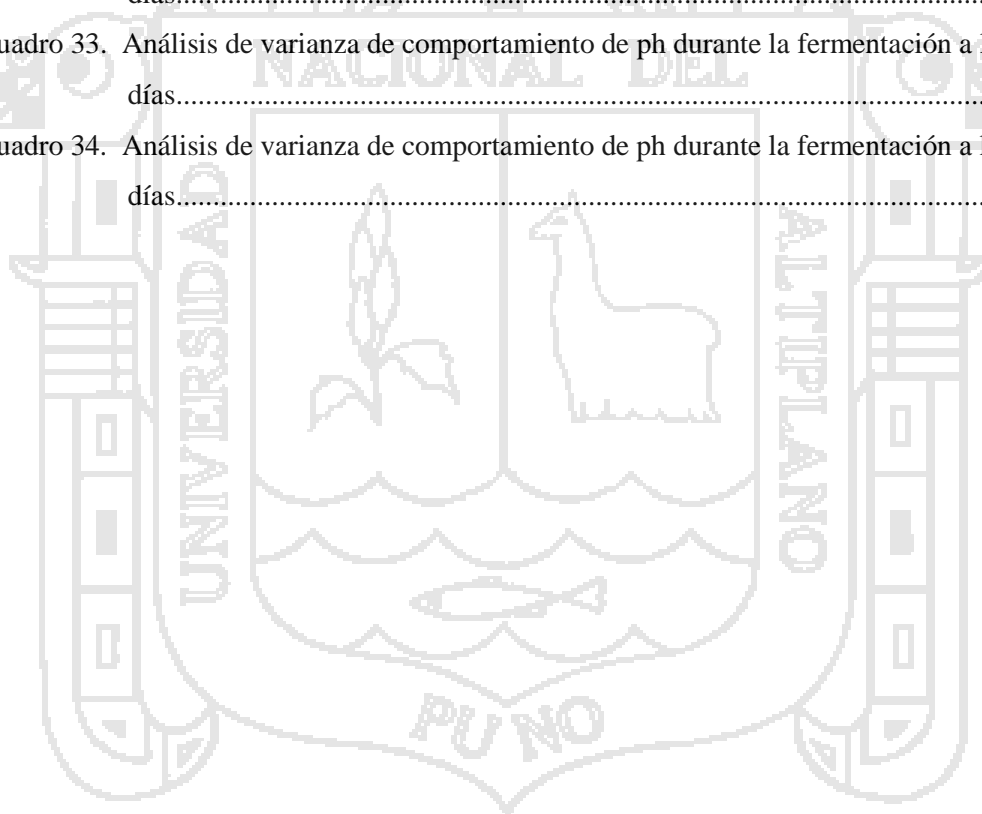
5.3	VIDA ÚTIL DE ENSILADO BIOLÓGICO.....	51
5.3.1	PH.....	51
5.3.1.1	ANVA de valores de pH.....	54
5.3.2	ACIDEZ.....	56
5.3.2.1	ANVA de porcentaje de acidez.....	57
5.3.3	ANÁLISIS SENSORIAL.....	57
5.3.4	HISTAMINA.....	58
5.3.5	EVALUACIÓN DE DIGESTIBILIDAD DEL ENSILADO.....	61
	CONCLUSIONES.....	62
	RECOMENDACIONES.....	63
	BIBLIOGRAFÍA.....	64
	ANEXOS 79	
	ANEXO 1: ANÁLISIS PROXIMAL, PH, MICROBIOLÓGICO DE RESIDUOS DE TRUCHA.....	79
	ANEXO 2: ANALISIS ESTADÍSTICOS VALORES DE PH.....	83
	ANEXO 3: ANALISIS ESTADÍSTICOS DE PORCENTAJE DE ACIDEZ.....	88
	ANEXO 4: ENSAYOS DE LABORATORIO DE DIGESTIBILIDAD.....	91



ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Rendimiento de trucha.....	3
Cuadro 2. Residuos de trucha generados en puno.....	4
Cuadro 3. Producción de trucha y residuos hidrobiológicos en la región puno.....	8
Cuadro 4. Evaluación de olor en el proceso de fermentación.....	31
Cuadro 5. Diseño experimental para la cebada.....	33
Cuadro 6. Diseño experimental para la papa.....	33
Cuadro 7. Diseño experimental para el arroz.....	34
Cuadro 8. Formulaciones de los ensilados n=3.....	37
Cuadro 9. Tiempo y temperatura sugeridos por el diseño compuesto central para la optimización del crecimiento de koji en cebada, papa y arroz.....	48
Cuadro 10. Conteo de hongos en ufc/g según la tiempo y temperatura de incubación establecida en la cuadro 8 para cebada, papa y arroz.....	48
Cuadro 11. Formulación de ensilados de residuos de trucha n=3.....	49
Cuadro 12. Resultados de anva de los valores de ph de los tratamientos.....	55
Cuadro 13. Resultados de análisis de anva de los valores de % de acidez.....	57
Cuadro 14. Valores promedio y desviación estándar de histamina (mg/kg de ensilado) a los 25, 52 y 90 días de almacenamiento.....	59
Cuadro 15. Prueba de digestibilidad de ensilado biológico.....	61
Cuadro 16. Composición química proximal de los residuos de trucha y de trucha muerta por flavobacteriosis.....	79
Cuadro 17. Lecturas de pH.....	80
Cuadro 18. Valores de olor.....	82
Cuadro 19. Composición proximal de ensilado bilógico de trucha.....	83
Cuadro 20. Composición proximal de dos muestras de ensilado bilógico de trucha.....	83
Cuadro 21. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación día 01.....	83
Cuadro 22. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 7 días.....	84
Cuadro 23. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 11 días.....	84
Cuadro 24. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 28 días.....	85
Cuadro 25. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 40 días.....	85

Cuadro 26. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 55 días.....	86
Cuadro 27. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 79 días.....	86
Cuadro 28. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 93 días.....	87
Cuadro 29. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 1 días.....	88
Cuadro 30. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 7 días.....	88
Cuadro 31. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 11 días.....	89
Cuadro 32. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 26 días.....	89
Cuadro 33. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 55 días.....	90
Cuadro 34. Análisis de varianza de comportamiento de ph durante la fermentación a los 93 días.....	90



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Suministro mundial de pescado.....	6
Figura 2. Evolución de la producción de la trucha en Perú.....	7
Figura 3. Porcentaje de producción de trucha en las provincias de puno	8
Figura 4. Cambios en la microflora durante el proceso de fermentación de los ensilados	21
Figura 5. a) Cebada en cocción b) Koji crecido en cebada luego de 48	32
Figura 6. a) Papa koji crecido 24h b) Koji crecido 48h	33
Figura 7. a) Koji crecido en arroz 24 H b) Koji crecido luego de 48h.....	34
Figura 8. Molienda de residuos de trucha.....	36
Figura 9. a) Residuos triturados b) y c) Preparación de formulaciones	37
Figura 10. Mezcla de residuos de trucha molida, melaza, koji crecido en sustrato	38
Figura 11. Control de la temperatura y del ph en el ensilado.....	39
Figura 12. Efectos de tiempo y temperatura en el crecimiento del <i>a. orizae</i> en cebada.	46
Figura 13. Efecto de tiempo y temperatura en el crecimiento del <i>a. orizae</i> en papa	47
Figura 14. Efecto de temperatura y tiempo en el crecimiento del <i>a. orizae</i> en arroz.....	47
Figura 15. Influencia de los tratamientos (t1, t2, t3 y t4), del tiempo sobre el valor de pH.....	52
Figura 16. Valores de porcentaje de acidez (ácido láctico) en función al tiempo.....	56
Figura 17. Calificación en el olor de las muestras de ensilado	58
Figura 18. Valores de histamina de los tratamientos T1, T2 Y T3	59

RESUMEN

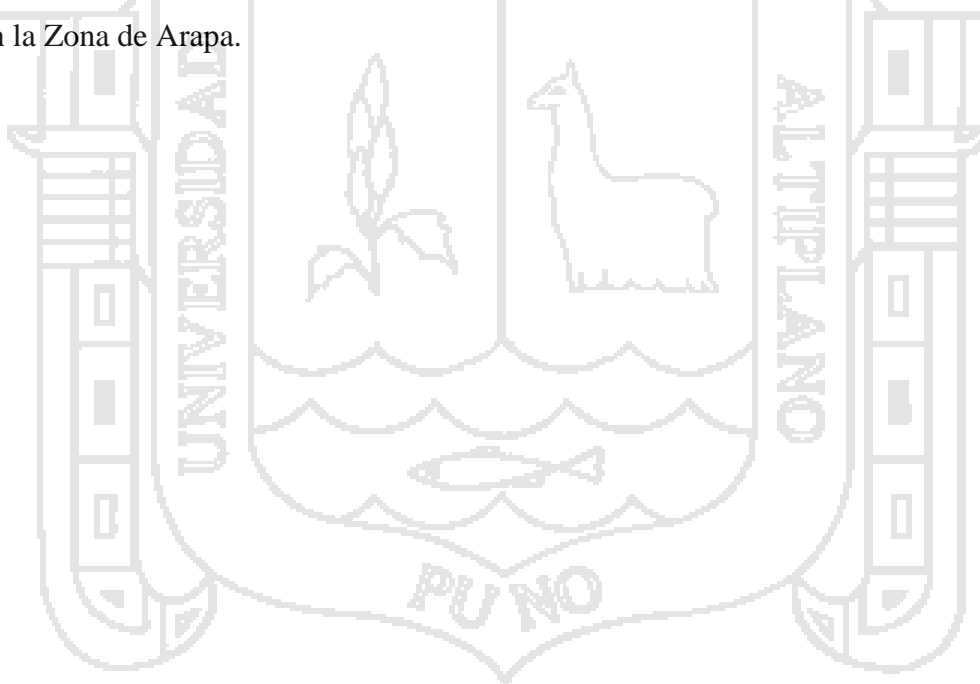
El objetivo del trabajo de investigación fue obtener una formulación óptima del proceso de ensilado biológico a partir de los residuos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y la determinación de vida útil, en la empresa Arapa S.A.C., en la Región de Puno. Se desarrolló una técnica de fermentación con “koji” (*Aspergillus orizae* y *Sacharomises cerevisae*) a diferentes temperaturas y tiempos en sustratos como la cebada (20-45°C y 12-60 h), papa (20-40°C y 24 a 72 h) y arroz (20-45°C y 12-60 h) y los resultados fueron analizados mediante el método de superficie de respuesta. Se realizaron formulaciones para el procesamiento de ensilado usando tres insumos (residuos de truchas, melaza y cultivo de “koji” desarrollado en los sustratos de cebada, papa y arroz). Los parámetros considerados para determinar la formulación óptima y la vida útil fueron el pH, % de acidez, el olor y el contenido de Histamina. Respecto a la formulación, se tuvieron 4 formulas (tratamientos = T) fueron desarrolladas durante 93 días. Las cantidades de los tres insumos que se consideraron en cada uno de los cuatro tratamientos desarrollados fueron; el T1 (3000 g, 450g y 300 g de “koji” en papa), el T2 (3000 g, 450g y 300 g de “koji” en arroz), el T3 (3000 g, 200g y 550 g de “koji” en arroz) y el T4 (3000 g, 450g y 300 g de “koji” en cebada). Los parámetros (pH y olor) fueron registrados cada 24 horas, y los resultados fueron analizados a los 1, 7, 28, 40, 50, 79 y 93 días, mientras que el % de acidez a los 1, 7, 11 y 26 días y el de histamina a los 25, 52 y 93 días de fermentación del ensilado. Los resultados obtenidos indican que el cultivo de “koji” se desarrolló mejor a diferentes parámetros (temperatura y tiempo) en la cebada (25°C y 60 h), en la papa (26°C y 62 h) y en el arroz (26°C y 60 h). Asimismo, los resultados en las variables en estudio (pH, % de acidez, olor) a los 7 días fueron para el T1 (4.47, 0.87, 5.0), T2 (4.54, 0.92, 4.0), T3 (4.69, 2.35, 4.0) y el T4 (5.55, 1.89, 2.0) y fueron estadísticamente diferentes ($P < 0.001$), mientras que a los 93 días los parámetros (pH, olor e Histamina) se evaluaron en tres tratamientos y los resultados fueron diferentes ($P < 0.03$) para el T1 (4.39, 5.0 y 141.10), T2 (4.41, 5.0 y 83.70) y T3 (4.63, 3.0 y 82.40) se mantuvieron mejores para los tratamientos T1 y T2. Finalmente, podemos concluir que el tratamiento 2 fue la mejor formulación de ensilado de residuos de trucha, debido a su rápida reducción en el pH, mejor olor, menor contenido de Histamina y estabilidad del producto hasta los 93 días que duró el experimento, por lo que se recomienda su utilización.

Palabras clave: *Ensilado biológico, trucha, koji.*

INTRODUCCIÓN

En nuestro país, el cultivo de trucha ha presentado un crecimiento sostenido en los últimos años, alcanzando volúmenes de producción de casi 40,000 toneladas al 2014(SIICEX, 2014). De este volumen, aproximadamente el 75% corresponde a la producción en Puno, se estima que los residuos generados por la comercialización de la trucha fresca eviscerada, deshuesada o en filetes alcanza un volumen de 15,000 toneladas de residuos, de los cuales la empresa Arapa San Pedro y San Pablo S.A.C, produce 10 t semanalmente, lo cual representa un problema de contaminación, si no es manejado de manera conveniente. En ese sentido, el ensilado de residuos crudos se presenta como una alternativa tecnológica simple, de baja demanda de energía eléctrica, baja inversión, no requiere de equipos costosos, ni mano de obra altamente calificada. El ensilado se basa en la fermentación ácido-láctica, obteniéndose al final del proceso un producto líquido-pastoso acidificado estable con alto valor biológico, que puede ser empleado como insumo en la preparación de dietas para alimentación animal. Existen diversos tipos de ensilaje de pescado o de sus residuos, algunos usan ácidos orgánicos (fórmico, propionico) o inorgánicos (sulfúrico y clorhídrico) de menor precio, llegando rápidamente a pH de 3.8 a 4,0, requiriéndose aproximadamente el 2.5 % de ácido (por peso) (Hertrampf y Piedad-Pascual, 2000), otros ensilados como el biológico, requiere microorganismos. Al respecto, en el Instituto tecnológico Pesquero del Perú realizaron ensilados de residuos cocidos de pescado con bacterias lácticas, que sirvieron para alimentación de pollos y cerdos (Areche y Berenz, 1990; Berenz et al., 1994), el proceso requería consumo de energía para la cocción de residuos y la incubación a 40 °C. Luego, con la finalidad de disminuir los costos de producción, Albrecht y Torpoco (2008) elaboraron ensilado de residuos crudos, en las proporciones 9:1:1 de residuos crudos de pescado:melaza:koji(*Aspergillus orizae*, *Zigosaccharomyces rouxii* y *Tetragenococcus halophilus*), a 37°C de incubación, logrando alcanzar valores de pH < 4,5 en ensilados de residuos de Jurel, Caballa y Machete, ése pH fue mantenido desde el 15 al día 30 de almacenamiento a temperatura ambiente (18-26°C), posterior a ese periodo, aumentó el pH. Así mismo, Albrecht y Salas (2013) emplearon Koji para elaborar ensilado en las proporciones 10:1,5:1,0 de residuo crudo de anchoveta:melaza:koji(Cepas de *Aspergillus orizae*)respectivamente, un grupo de muestras de ensilado fue almacenado al ambiente y otro grupo a 40 °C por 96 horas, las muestras almacenadas al ambiente presentaron valores de pH cercanos a 4,5 a los 21

días, subiendo el valor de pH a los 90 días, el grupo que fue llevado a 40°C (durante 96 horas y luego almacenado al ambiente) mantuvieron valores de pH < 4,5 desde los 3 a 90 días. Con el presente proyecto la empresa Arapa San Pedro y San Pablo S.A.C. incrementará su rentabilidad debido a la producción de ensilados a partir de los residuos de trucha, obteniendo un producto nuevo y una nueva línea que por su alta calidad y bajo costo, será utilizado para reemplazar un producto caro como la harina de pescado. Asimismo, se beneficiará a los procesadores de trucha, quienes podrán vender los residuos generados por su actividad. En tal sentido la importancia del presente proyecto será contribuir a un mejor manejo y utilidad de los residuos de trucha, ya que existen un incremento considerable de la población del recurso “trucha” en estos últimos años tomando como ejemplo la siembra realizada por los productores de lago ARAPA 2013 fueron 7.5 millones de alevinos, 2014 11 millones, 2015 ascienden a 12 millones y se estima que para el año 2016 en el departamento de Puno alcance 100 a 150 millones de alevinos. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue la elaboración de un ensilado biológico a partir de residuos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*), a temperatura ambiente, en la Zona de Arapa.



CAPITULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

En la industria de productos pesqueros existen residuos de pescado (cabeza, vísceras, espinazos, etc.). Que constituyen alrededor de 50 a 60% de la materia prima, también existen cantidades considerables de especies deteriorados o de bajo valor comercial que son descartados, particularmente en Puno, el rendimiento de la trucha se muestra Cuadro 01.

Cuadro 1. Rendimiento de trucha.

Componente	RENDIMIENTO		
	ITP*	ARAPA S.A.C.	AQUASEM**
Vísceras, %	14,00	13,00	15,00
cabeza, %	22,00	20,00	22,00
Aleta y espinazo,%	13,00	11,00	12,00
Piel, %	1,00	1,00	1,00
Filete, %	50,00	55,00	50,00

FUENTE: *Compendio Tecnológico Pesquero IMARPE/ITP, 1990, Arapa S.A.C., 2015. **Aquasem, 2015.

Las cantidades de los residuos generados en las plantas de transformación de Puno se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 2. Residuos de trucha generados en Puno.

Componente	PLANTAS DE TRANSFORMACION DE TRUCHA			
	PELT	ARAPA SAC	AQUASEM	PISCIFACTORIA LOS ANDES
Materia prima (Kg/Día)	700,00	1.000,00	1.200,00	5000
Residuos (Kg/día)	357,00	550,00	600,00	2500
Truchas en mal estado(Kg/día)	10,00	6,00	9,00	25
Proceso	DISCONTINUO	DISCONTINUO	DISCONTINUO	DISCONTINUO

FUENTE: Elaboración propia, 2015.

Los residuos poseen un contenido proteico, pero debido a la presencia de enzimas tienen la particularidad de sufrir rápidos procesos de alteración, produciendo malos olores, problemas de polución y contaminación ambiental, por lo que es necesario darle un uso adecuado para aprovechar las proteínas presentes y utilizar como un sustituto de harina de pescado para la alimentación animal.

Las plantas de transformación de trucha; ARAPA S.A.C., AQUASEM, PISFACTORIA LOS ANDES y otras micro y pequeñas empresas dedicadas a la producción primaria de trucha generan acumulación de residuos o subproductos de trucha en el Departamento de Puno, que por su poca estabilidad tienden a deteriorarse, a su vez no son aprovechadas.

Los residuos del procesamiento de trucha están contaminando el aire, suelo y agua, el proyecto plantea implementar una técnica sencilla de tratamiento de residuos de trucha, evitando de este modo la descomposición de materia orgánica.

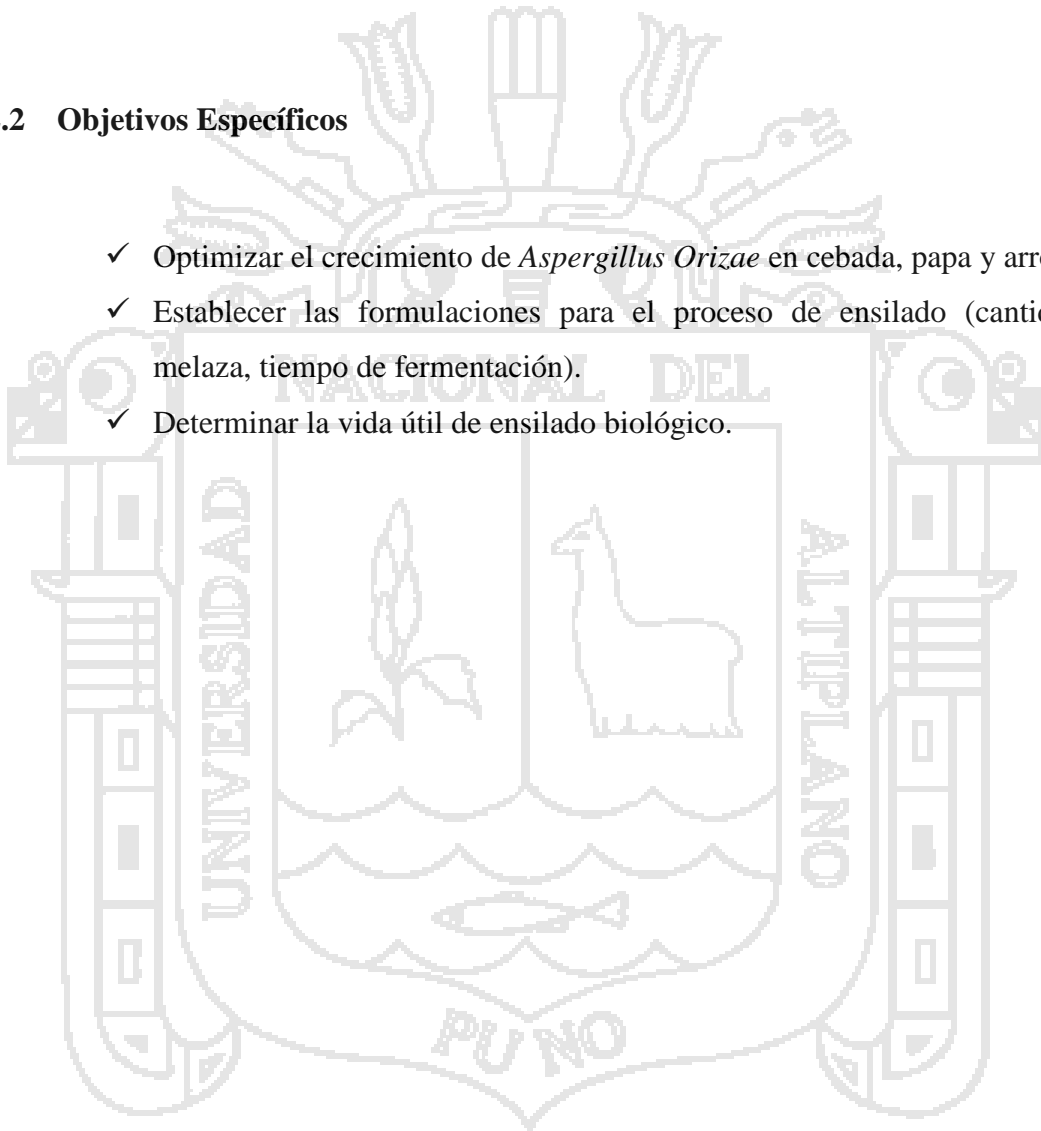
1.2 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.2.1 Objetivo General

Obtener una formulación óptima del proceso de ensilado biológico a partir de los residuos de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y la determinación de vida útil en la empresa Arapa San Pedro y San Pablo S.A.C. de Puno.

1.2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Optimizar el crecimiento de *Aspergillus Orizae* en cebada, papa y arroz.
- ✓ Establecer las formulaciones para el proceso de ensilado (cantidad de melaza, tiempo de fermentación).
- ✓ Determinar la vida útil de ensilado biológico.



CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 MARCO TEORICO

2.1.1 SUMINISTRO MUNDIAL DE PESCADO

Científicos proyectan que la producción de alimentos de origen acuático alcanzaría los 186 millones de toneladas en el año 2030, siendo la acuicultura el principal responsable de este crecimiento. El mundo se enfrenta con un gran desafío, el alimentar a una creciente población mundial que llegará a los 9 600 millones de personas en el año 2050. Un incremento en la producción de alimentos debe darse, en un contexto donde los recursos necesarios empiezan a escasear. La producción mundial de alimentos de origen acuático (pescados y mariscos) ya representan el 16.6% de toda la proteína animal que se consume, y esta proporción continúa incrementándose. Kobayashi, en base a su modelo, precisa que el 62% de pescado para consumo humano directo será producido por la acuicultura en el año 2030 (Kobayashi, 2015).

2.1.2 PROYECCIONES DE LA PESCA Y ACUICULTURA MUNDIAL

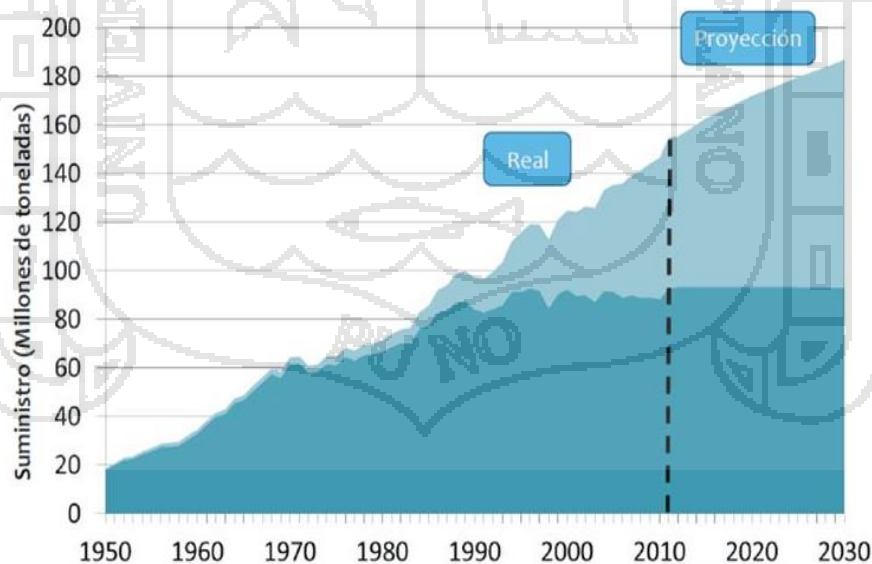


Figura 1. Suministro mundial de pescado

Fuente. DIREPRO PUNO, 2016.

2.1.3 EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE LA TRUCHA EN PERÚ

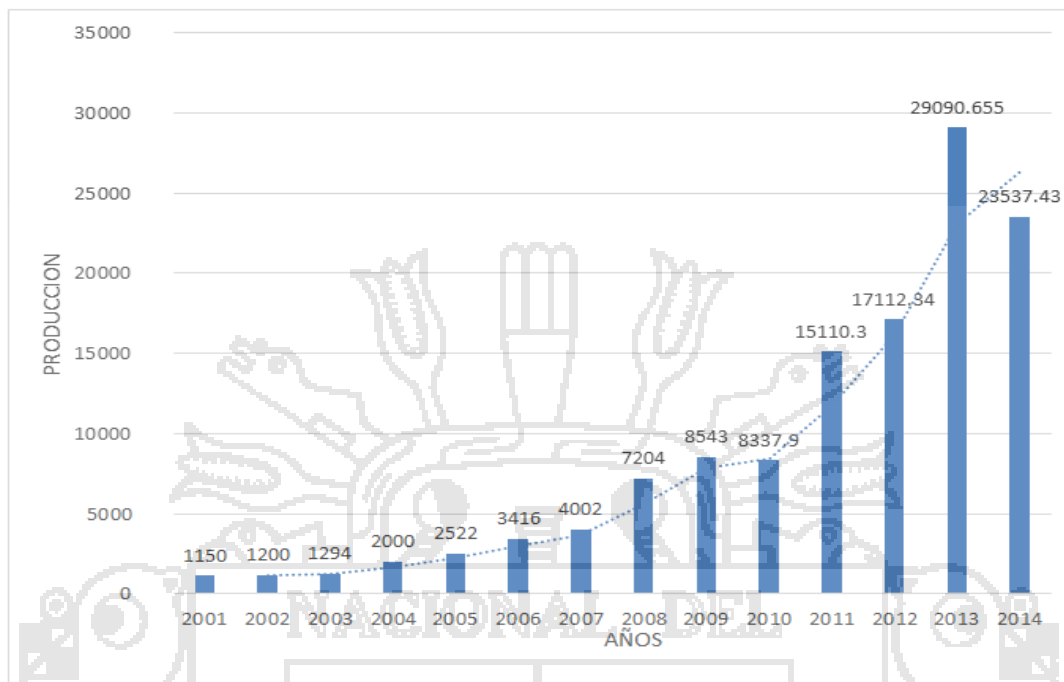


Figura 2. Evolución de la producción de la trucha en Perú

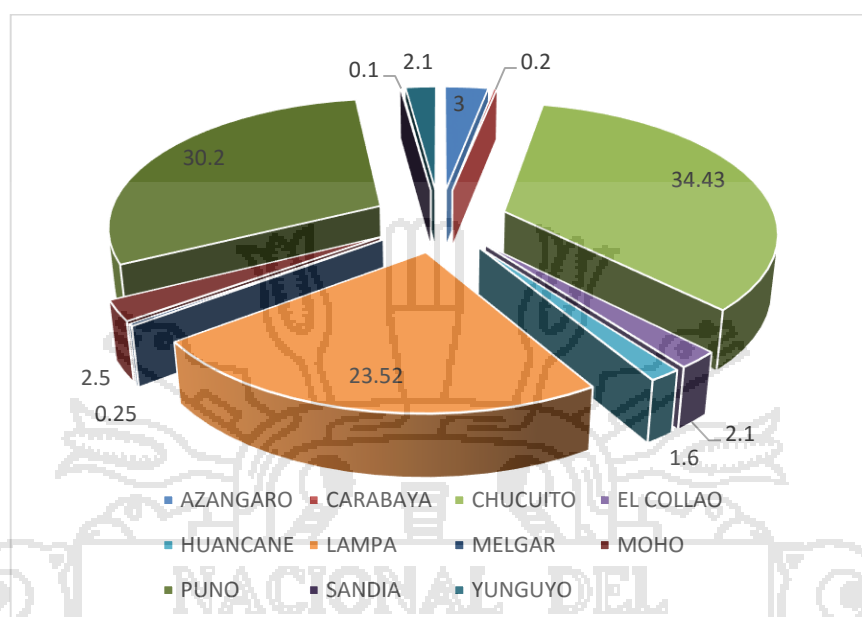
Fuente. DIREPRO PUNO, 2016.

2.1.4 EMPRESAS CONSTITUIDAS A LA PRODUCCIÓN DE TRUCHA EN PUNO

En la actualidad existen alrededor de 785 empresas o productores dedicados a la crianza de truchas, de las cuales 705 tienen capacidad de producción mayor a 2 TM., denominada de mediana escala; y otras 80 empresas, con capacidad menor a 2 TM., denominadas empresas de subsistencia, así mismo se encuentran en trámite de autorización aproximadamente 200 productores. (DIREPRO, 2016).

2.1.5 PRODUCCION DE TRUCHA EN LAS PROVINCIA DE PUNO

Figura 3. Porcentaje de producción de trucha en las provincias de Puno



FUENTE: DIREPRO PUNO, 2016.

2.1.6 PRODUCCIÓN DE TRUCHA Y VÍSCERAS EN LA REGIÓN DE PUNO

Cuadro 3. Producción de trucha y residuos hidrobiológicos en la región Puno.

AÑO	PRODUCCION	
	TRUCHAS (Kg)	VISCERAS (Kg)
2011	15110310.60	656165.24
2012	17739493.20	706834.32
2013	29090655.00	126361.69
2014	27588577.50	827657.33
2015	33264497.00	1444510.78

FUENTE: DIREPRO PUNO, 2016.

2.2 CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

La contaminación es un cambio perjudicial en las características físicas, químicas o biológicas del aire, la tierra o el agua, que puede afectar nocivamente la vida humana o la de especies beneficiosas, los procesos industriales, y las condiciones de vida del ser humano pueden malgastar y deteriorar los recursos naturales renovables o no renovables (De la Orden, 2007).

El desarrollo industrial y tecnológico característico de las sociedades actuales, ha creado de manera alarmante una enorme cantidad de desechos que la naturaleza es incapaz de reintegrar a la misma velocidad con que se generan. Esto ha provocado una serie de trastornos que originan en deterioro de nuestra calidad de vida a causa del fenómeno llamado contaminación (Nebel, 2005).

2.2.1 ORIGEN DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

El origen de la contaminación ambiental puede ser natural o debido a la actividad humana. De forma natural, puede afectar tanto al aire, al agua o al suelo, en el aire por ejemplo se da por episodios generados por la propia naturaleza como las erupciones volcánicas, en el agua también se presenta al inicio de la época de lluvias. Por la acción del hombre la contaminación se produce como resultado de las actividades productivas, la mayoría de estas implica procesos de transformación de recursos o de materiales, con la subsecuente generación de residuos o desechos lanzados al ambiente (Romero, 2010).

Cuando el tamaño de población mundial no era tan grande, las actividades realizadas por el hombre no implicaban tanto la transformación de recursos como sucede hoy, por lo que la cantidad y tipo de contaminantes son más peligrosos actualmente (Spiegel y Lucien, 2007).

2.2.2 CLASES DE CONTAMINACIÓN

2.2.2.1 Contaminación del aire

La civilización industrial da origen a una elevada cantidad de desechos, de los cuales una parte significativa pasa a la atmósfera. De este modo, se produce una importante alteración de la composición del aire atmosférico. Una vez superados ciertos niveles de tolerancia ponen en peligro la salud de los ecosistemas y las poblaciones.

En las grandes ciudades, la contaminación del aire es consecuencia de los escapes de gases de los motores de explosión, de los aparatos domésticos de la calefacción, de las industrias que es liberado en la atmósfera, ya sea como gases, vapores o partículas sólidas capaces de mantenerse en suspensión, con valores superiores a los normales. Cuando las concentraciones de gases y sólidos superan las concentraciones admitidas perjudican la vida y la salud, tanto del ser humano como de animales y plantas (De la Orden, 2007).

2.2.2.2 Contaminación del suelo

Un suelo se puede degradar al acumularse en él sustancias perjudiciales que afecten en su composición o comportamiento, y cuando estas sustancias se vuelven tóxicas inicia una degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo. Las causas más frecuentes de contaminación son debidas a la actuación antrópica, que al desarrollarse sin la necesaria planificación producen un cambio negativo de las propiedades del suelo (Nebel, 2005).

2.2.2.3 Contaminación del agua

La industrialización de las fábricas ocasionó que se busquen lugares propicios para su funcionamiento siendo estos lugares cercanos a cursos de agua, que los convirtió en receptores de los desperdicios de las actividades industriales y humanas.

Las plantas de tratamiento, aún las más avanzadas técnicamente, son incapaces de remover, transformar o destruir los compuestos orgánicos sintéticos que son el resultado de los procesos industriales. Todo esto complica el proceso de purificación de las plantas de tratamiento de aguas (Romero, 2010). La contaminación del agua pone en peligro la salud pública, interfiere con el desarrollo de enfermedades, además puede causar serios problemas en el abastecimiento de agua pura a las industrias, perjudica también la actividad pesquera y anula el valor estético de los cursos superficiales (Nebel, 2005).

2.2.3 TIPOS DE CONTAMINANTES

Se puede dividir a los contaminantes en biodegradables y no biodegradables. Los contaminantes biodegradables u orgánicos son aquellos materiales que pueden ser descompuestos por la acción de organismos vivos, como lombrices, hongos y bacterias principalmente. Este fenómeno permite que los elementos que forman tales residuos queden disponibles para su nueva incorporación a la naturaleza de manera útil. Los contaminantes no biodegradables son aquellas que no pueden desintegrarse naturalmente o bien, si esto es posible, sufren una descomposición demasiado lenta, este factor los hace más peligrosos que los anteriores, su acumulación en la naturaleza es progresiva (Romero, 2010).

2.2.4 FUENTES DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS

2.2.4.1 ACTIVIDAD AGROPECUARIA

En esta actividad, se generan una gran variedad de residuos de origen vegetal y animal. Los residuos vegetales están integrados por restos de cosechas y cultivos procedentes de diversas especies cultivadas. Entre los residuos animales, se incluyen excrementos sólidos y semisólidos (estiércoles) y líquidos purines. Desechos de faena, cadáveres, sobrantes de suero y leche, etc. Los estiércoles y purines son los residuos que presentan mayor interés por la concentración espacial que alcanzan en producciones como la lechera, avicultura, entre otros y por el impacto ambiental negativo que producen en la mayoría de los casos (Romero, 2010).

2.2.4.1.1 Subproducto de origen animal

Son aquellos residuos de la explotación de cualquier animal que no se utilizan en la elaboración de productos primarios, y que pueden tener algún otro aprovechamiento (Paltrinieri, 2009).

Las ventajas de la utilización de subproductos animales pueden ser económicas, con su recuperación permiten obtener una remuneración que no hubiera sido posible desperdiciándolos. Higiénicas pues se reduce el riesgo de atraer plagas, que vuelven el lugar insalubre, creando peligro de epidemias y aumento de la contaminación (Paltrinieri, 2009).

2.2.4.2 ACTIVIDAD AGROINDUSTRIAL

Existe una gran diversidad de residuos generados en la actividad agroindustrial. Las características cuantitativas y cualitativas de los mismos dependen de numerosos factores. Muchos residuos de las actividades agroindustriales son reutilizados a través de alternativas que se aplican, desde hace ya algunos años, con menor o mayor grado de eficacia. Para otros residuos agroindustriales aún no existen alternativas de transformación en insumos útiles dentro de un marco económico viable (Sztern y Pravia, 2009).

2.2.4.3 INDUSTRIA DE LA PESCA

La parte aprovechable que se obtiene del pescado para la alimentación es solamente el 50 a 80% aproximado de su peso, no se utilizan las cabezas, esqueletos, vísceras, escamas y aletas. Toda esa masa de pescado era y, por desgracia, sigue siendo, en gran parte desaprovechada. La FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación tiene entre sus objetivos reducir los descartes de la pesca al máximo a través de una actividad más responsable. No obstante, en el caso de que sea imposible evitarlo, también quiere hallar salidas comerciales a esos residuos como fuente de proteínas (Maroto, 2010).

La importancia de la industria de los subproductos de pescado es extraordinaria, tanto desde el punto de vista económico como de los elementos que

se obtienen de ella útiles al hombre, como son las harinas, aceites, productos farmacéuticos y abonos (Sztern y Pravia, 2009).

2.2.4.3.1 Vísceras

Las vísceras de pescado de agua dulce constituyen entre el 5 y 11% del peso corporal. Su composición química promedio es 76,6% agua, 20,4% proteína, y 3% minerales” (Sztern y Pravia, 2009).

El ensilaje de vísceras de pescado se ha venido utilizando como alternativa para conservar los subproductos del pescado, los cuales tienen uso potencial como fuente de proteína en dietas para cerdos. A pesar de ser residuos complejos, las vísceras de pescado se pueden tratar mediante procesos biológicos o una combinación de procesos físico-químicos y biológicos (Álvarez, 2008).

2.2.4.3.2 Colas y Aletas

La obtención de pegamentos y gelatinas a partir del pescado se realiza por el tratamiento de tejidos conjuntivos y pieles, es decir, de aquellas estructuras en cuya composición interviene la sustancia colágena (Álvarez, 2008).

2.2.4.3.3 Cabezas y espinas

El contenido medio de calcio de pescados y mariscos ronda el 30% en los esqueletos o espinas de los peces se acumula una rica fuente de calcio mineral que varía en contenido según la especie. Las cabezas y los desechos de camarón permiten fabricar una harina que contiene el 30% de proteínas, esto representa el 30% del peso vivo del animal (Maroto, 2010).

2.3 ENSILAJE

El ensilado es un proceso de conservación de forrajes u otros alimentos con elevado contenido en humedad (65 a 70%), en ausencia de aire (anaerobiosis), de luz y de la humedad exterior, mediante acidificación, que impide la continuidad de la vida vegetal y de la actividad microbiana indeseable como (*Clostridia*, *listeria*, coliformes, hongos y levaduras) (Rodríguez y Díaz, 2005; De la Roza, 2005; León, 2003). Esta acidificación, medible en forma de pH, más acidez) se consigue mediante fermentaciones que tienen

lugar en el ensilado dando como resultado la producción de ácidos orgánicos, principalmente ácido láctico y cantidades menores de otros ácidos como acético y propionico. El objetivo principal de producir ensilajes es preservar al máximo posible el valor nutricional del forraje original (León, 2003; Díaz, 2005).

La producción de ensilado es considerada como una de las mejores maneras de preservar los desperdicios agrícolas y animales. La conversión de desperdicio de pescado a ensilaje, tiene la ventaja de ser un suplemento barato en la alimentación animal, mientras se reduce el desperdicio y la contaminación ambiental (Zynudheen *et al.*, 2008).

2.3.1 PROCESO DE ENSILAJE

El principio básico de la fermentación anaeróbica o producción de ensilaje es la preservación de nutrientes del material fresco (residuo orgánico). La producción de ensilaje mediante la formulación anaeróbica requiere de la presencia de microorganismos productores de ácido láctico y de una fuente de carbohidratos solubles en agua. Durante la degradación de los carbohidratos por parte de los microorganismos se producen ácidos orgánicos (acético y láctico) que generan una disminución en el pH. La acidez proviene la proliferación de microorganismos indeseables (coliformes, hongos, levaduras) y la putrefacción de deterioro del subproducto.

2.3.2 ENSILADO

En el Perú, el sector pesquero constituye una de las bases importantes para el crecimiento de la economía nacional, estableciéndose en el sector productivo que busca consolidar su equilibrio de desarrollo socio-económico, así como un ordenamiento técnico, ambiental de la actividad pesquera y acuícola, lo cual contribuye a mejorar la calidad de vida, proteger el medio ambiente y su biodiversidad. La imagen de sector pesquero en el exterior es de vital importancia en el mercado internacional, por ello se considera trascendente el tratamiento de los residuos sólidos de modo ordenado. En tal sentido la Dirección General de Asuntos Ambientales de Pesquería del Ministerio de la Producción ha implementado como Unidad Orgánica la Dirección de Gestión Ambiental de Residuos Sólidos e Hidrocarburos (DARRSS), a fin de cumplir con lo exigido por la norma (Ministerio de Producción, 2010).

En los países, un volumen importante de residuos es obtenido de la acuicultura, la pesca y la elaboración de productos a base de pescado, que pueden llegar a constituir un 70% del peso inicial. También de descartes de la fauna acompañante y otras pérdidas ocasionadas por la manipulación, procesamiento, almacenamiento y comercialización del pescado fresco. Por lo tanto, es necesario utilizar tecnologías simples y de baja inversión que permitan el aprovechamiento de esa proteína de origen animal y de esta forma minimizar los efectos de la contaminación ambiental (Toledo y Llanes, 2006). De no tratarse adecuadamente los residuos de pescados, ocurre en los residuos una proteólisis indeseable, resultando en la producción de Nitrógeno-amoniaco, y las aminas cadaverina y putresina, que emiten un olor desagradable (Díaz, 2004).

Actualmente, algunos de estos residuos de acuicultura se utilizan para la elaboración de productos alimenticios, como aceites, harinas, alimentos líquidos y semilíquidos, y ensilajes para el uso en la industria pecuaria (Díaz, 2004; León 2003).

El ensilado de pescado es un producto semi-líquido o pastoso, que aprovecha los residuos de desechos de la industria pesquera, pescado entero no apto para consumo humano o partes del mismo, tales como cabeza, colas, huesos, piel, escamas y vísceras. El ensilado de pescado es de fácil elaboración y de bajo costo y que puede ser componente de raciones alimenticias para animales. Es un producto que no atrae insectos indeseables ni olores desagradables (Toledo y Llanes, 2006; Bello, 1994; Berenz 1994; Parin y Zagarramurdi, 1994; Gonzales *et al.*, 2007). El ensilado de pescado es un alimento que posee gran digestibilidad, cualidad que le proporciona un gran beneficio en alimentación animal, sin dejar de mencionar que las proteínas que lo constituyen son de un elevado valor biológico (Balsinde *et al.*, 2003).

Diversas metodologías de ensilaje (conservación de materias orgánicas) de desechos sólidos de pescado se emplean en la alimentación animal, lo cual puede contribuir a la conversión de subproductos desechables en ingredientes alimentarios utilizables (Llanes *et al.*, 2007).

El ensilaje de pescado, puede designarse como pescado líquido o concentrado de proteína (Díaz, 2004), y se produce mediante fermentación anaeróbica (ensilado biológico) o acidificación (ensilado químico). Esto se hace con el objetivo de reducir el pH del

material a preservarse lo suficiente (pH- 4.5) como para evitar el crecimiento de microorganismos patógenos (Llanes *et al.*, 2007; Díaz, 2004; León, 2003; González y Marín, 2005).

En los dos métodos existentes para la producción de ensilaje de pescado (químico y biológico), se tiene en común las operaciones de molienda, homogenización, envasado y almacenamiento, así como la eliminación de material adulterante o indeseado que acompañe la materia prima (León, 2003).

2.3.2.1 ENSILADO QUÍMICO

El ensilado químico es elaborado por la adición de ácidos minerales y/o orgánicos al pescado triturado. Los ácidos se han empleado solos; como el fórmico, sulfúrico, clorhídrico, propiónico; o combinados; como mezclas de acético, fórmico y fosfórico, fórmico y sulfúrico ó propiónico y sulfúrico. El ensilado químico, aunque más sencillo en su elaboración es costoso por la adquisición de los ácidos, se requiere equipo anticorrosivo y representa un peligro en su manipulación y almacenamiento. Además, los ácidos antes mencionados a excepto del fórmico requieren neutralización; antes de su empleo en la alimentación animal; por el excesivo descenso del pH en el producto (Bello, 1994; Parin y Zugarramurdi, 1994; Córdova y Bello, 1986; Ojeda, 1993).

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

Al utilizar ácidos minerales tales como el sulfúrico, clorhídrico o fosfórico, se requiere bajar el pH a 2 para alcanzar la inhibición microbiana completa. Por otra parte, el alto contenido de cenizas y proteínas del pescado tiene un efecto amortiguador, lo cual aumenta la cantidad de ácido requerido para lograr el valor de pH deseable; además, antes de ser aplicado el producto en alimentación animal se requiere de su neutralización y

resulta una concentración de sal elevada que es indeseable desde el punto de vista nutricional (Ockerman, y Hansen, 1994; Arason, 1994).

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

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

Las mayores desventajas de este método, si no se lleva a cabo apropiadamente, son los posibles problemas potenciales de toxicidad en los animales y los efectos corrosivos sobre equipos y la maquinaria (Díaz, 2004). Además, el costo de los ácidos, que son importados; y el manejo cuidadoso de estos ácidos, que son importados; y el manejo cuidadoso de estos ácidos por parte de los que preparen el silo, lo cual constituye un peligro y riesgo para ellos. El ensilado es un producto estable a temperatura ambiente por mucho tiempo y se utiliza principalmente en alimentación de aves y cerdos (Bello, 1993).

Contrariamente, el ácido láctico puede ser metabolizado fácilmente por animales como los peces sin causar daño alguno (Dong y col., 1993).

2.3.2.2 ENSILADO BIOLÓGICO

El ensilado de pescado puede definirse como un producto semilíquido, obtenido a partir de la totalidad del pescado entero o partes del mismo. Este estado se alcanza por efecto de las enzimas proteolíticas contenidas en el mismo pescado. Estas enzimas presentan su mayor actividad cuando el pH se reduce a valores cercanos a 4, por efecto de la producción o la adición de ácidos. A este pH se impide la descomposición del producto. El ensilado es un producto estable a temperatura ambiente por mucho tiempo. Los estudios

de estabilidad del ensilado muestran que es factible almacenarlo por períodos mayores a 6 meses sin requerir de refrigeración (Bello, 1992).

El ensilaje de pescado se hace a base de residuos de pescado, conservados con ácidos orgánicos o inorgánicos o mediante la fermentación láctica de un sustrato de carbohidratos que se les añade. La tecnología se conoce desde hace algún tiempo, pero la aplicación comercial no se ha extendido debido a sus costos de logística y sustitución, frente a otras fuentes de proteínas y otros métodos de elaboración. Aunque en el ensilaje de pescado se produce cierta hidrólisis de las proteínas para formar péptidos y aminoácidos, el valor nutritivo de la materia prima se mantiene y se puede utilizar para sustituir fuentes tradicionales de proteínas (FAO, 1995).

En el ensilado biológico se le agrega al pescado una fuente de carbono y un microorganismo, capaz de utilizar el sustrato y producir ácido láctico. Se han estudiado diferentes fuentes de carbono tales como harinas de maíz, harina de avena, cebada, malteada, arroz, yuca, azúcar, melaza, etc. y distintos organismos productores de ácido láctico, entre otros, *Lactobacillus plantarum*, bacterias lácticas del yogur y fermentos biológicos preparados con variedades de frutas y hortalizas como repollo, papaya, banana, piña, camote, yuca (Bello, Areche, Lessi, 1992).

En distintos trabajos se han realizado pruebas para establecer las proporciones mínimas tanto de las fuentes de carbohidratos como del inóculo microbiano necesarias para la producción de un ensilado estable y económico. En los mismos se ha establecido el *Lactobacillus plantarum* y la melaza como los agentes más eficientes y recomendables. El progreso, la eficiencia y la estabilidad del proceso ha sido evaluado mediante una variedad de ensayos físicos, químicos y microbiológicos 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*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* (Bello, 1992).

Tatterson y Windsor, (1974), manifiestan que el proceso de elaboración del ensilado requiere que las enzimas presentes en las vísceras sean esparcidas a través de la masa del pescado molido o mezclado. Para ello se utiliza una fuente de carbohidratos para

la producción de ácido (harinas de maíz, yuca, arroz y avena; almidón de maíz y melaza). Así mismo, Córdova *et al.*, (1990) definen que el ensilado biológico es un producto, líquido elaborado a partir de la masa de pescado entero o residuos triturados, previa adición de carbohidratos y la mezcla es fermentada por la adición de bacterias ácido lácticas, bajo condiciones controladas.

2.3.2.2.1 Procesos de acidificación y de hidrolisis

De acuerdo a los resultados de los estudios realizados del proceso del ensilado, pareciera que dicho proceso se puede dividir en dos fenómenos o fases distintas, pero que se complementan: una correspondiente a la hidrólisis o licuefacción, la cual está gobernada por las enzimas proteolíticas, y la otra correspondiente a la acidificación y reducción del pH, la cual está gobernada por la acción de los microorganismos ácido lácticos. Es posible acelerar uno de los dos fenómenos, sin alterar drásticamente el otro.

El pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento del ensilado biológico de pescado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier cambio que pueda afectar el producto. Adicionalmente el pH se puede medir muy fácil y rápidamente, inclusive fuera del establecimiento de producción (Van Wik y Heyderich ,1985).

Los hongos y levaduras también pueden influenciar significativamente en el proceso de ensilado. Estos microorganismos, son de tipo aeróbicos obligados, requiriendo para su crecimiento la presencia de oxígeno (O₂) o exposición aeróbica del material fermentado (Díaz, 2004). Los hongos tienen como principales productos de fermentación el acetato y etanol, además en ocasiones producen toxinas. Por otra parte, las levaduras se caracterizan por crecer como células sencillas capaces de fermentar azúcares, teniendo la habilidad para sobrevivir en condiciones anaeróbicas y niveles bajos de pH al existir una fuente de energía disponible (Díaz, 2004; León, 2003).

En otras palabras, existe un sistema de auto control, cuando se generan bases volátiles o compuestos nitrogenados que incrementen el pH, se inicia la producción de ácido por parte de los microorganismos, hasta que la cantidad de ácido en el medio sea

suficiente para reducir el pH a niveles cercanos a 4, y detener o controlar el crecimiento de las bacterias y por ende la producción de ácido.

Es importante que la cantidad de melaza añadida sea suficiente como para mantener un pequeño reservorio que les permita a las bacterias lácticas producir suficiente ácido en el momento que sea necesario. Este fenómeno puede verse en los resultados de los conteos de microorganismos mesófilos, los cuales incrementan en el momento en que el pH aumenta y luego disminuyen cuando la cantidad de ácido producida es suficiente para reducir nuevamente el pH a su valor cercano a 4 y auto inhibir el crecimiento microbiano. Esta tendencia de los microorganismos a incrementar y luego a disminuir fue observada por Van Wik y Heyderich (1985). Entre las diversas fuentes de carbono han sido utilizadas, lactosa (Hassan y Heath, 1987), dextrosa (Lassen, 1994), harina de maíz o tapioca (Fagbenro y Juncey, 1993), melaza de caña de azúcar (Guerouali y col., 1995; Fagbenro y Juncey, 1998; Vidotti y col., 2002; Zahar y col., 2002), sacarosa y lactosa (Enes Dapkevicius y col., 2007), aunque la melaza presenta ventajas por su menor precio y alto contenido de azúcares solubles. Además, la melaza presenta capacidad ligante, y mejora la estabilidad y características sensoriales del ensilado y los alimento en los cuales es incluido (Fagbenro y Juncey, 1998).

La producción de ácido por los microorganismos conduce a la caída del pH. De allí la importancia que tiene la medida del pH, porque no solamente está evaluando la producción de ácido, sino que también la actividad de los microorganismos ácido lácticos, la estabilidad y la calidad del ensilado. Los niveles de ácidos lácticos en el pescado son insuficientes para bajar el pH a valores que permitan suprimir el crecimiento de bacterias Gram-negativas. Por otra parte, el equilibrio entre la producción de ácido láctico y amonio en el pescado depende de la cantidad de azúcares libres disponibles en el sistema (Hall, 2002). Por lo tanto, la selección de la fuente de carbono y el nivel apropiado de esta son factores determinantes, ya que el proceso requiere carbohidratos fácilmente fermentables como una fuente de carbono para el crecimiento de las bacterias ácido lácticas; de modo que, se pueda lograr una excelente acidificación en tiempo corto (Cira y col., 2002).

Según Bello, (1993), el pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento del ensilado biológico de pescado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier

cambio que pueda afectar el producto. Anteriormente, (Fagenro *et al.*, 1993) citaron que la estabilidad de los ensilados biológicos de pescado se obtiene con valores de pH menores que 4.5. Dicho valor muestra la fase o fenómeno de acidificación por parte de microorganismos. En la figura 01 se observa que las bacterias coliformes solamente presentan actividad en la fase inicial del ensilado, siendo reemplazadas progresivamente por cocos lácticos (*Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*). posteriormente estos cocos son sustituidos por *Lactobacillus*, a excepción de los *Pediococcus* que son más tolerantes a la acidez que los otros grupos.

Las bacterias productoras de ácido láctico que llevan a cabo esta fermentación necesitan un pH comprendido entre 3 y 4 y condiciones de anaerobiosis. Finalmente, su acción es inhibida por escasez de azúcares solubles ya acumulación de ácido láctico. Cuando esto ocurre, el pescado queda estabilizado y se ha convertido en ensilado (De la Roza, 2005).

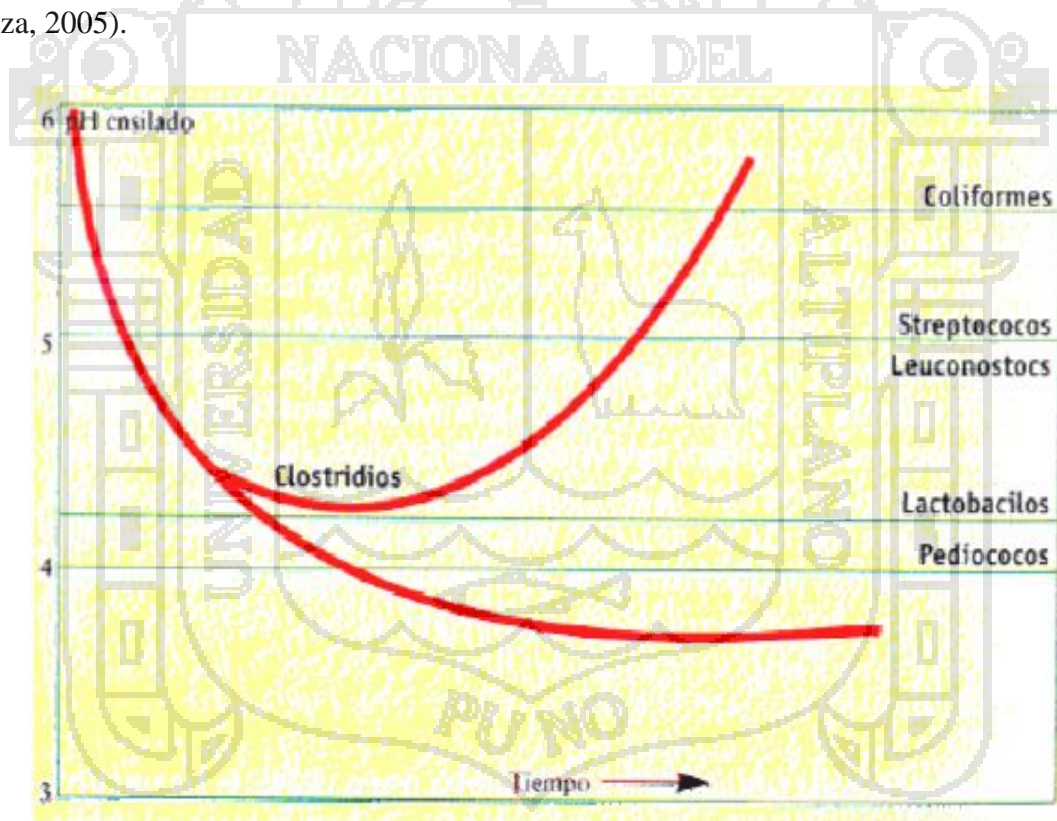


Figura 4. Cambios en la microflora durante el proceso de fermentación de los ensilados

Fuente. (De la Roza, 2005)

Álamo, (2003) no observo diferencias marcadas en el pH, composición química y características fermentativas del lodo fermentado de la industria atunera y residuos fermentados de la pesca expuestos al aire por 5 días, lo que sugiere que ambos materiales son aeróbicamente estables. Así mismo, Díaz ,(2004) no detecto cambios significativos en el pH, temperatura, productos de fermentación y población de hongos y levaduras en el ensilado de pescado con residuos del procesamiento de filete de tilapia (*Oreochromis niloticus*) con el 20% de melaza de caña y un inoculo con bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus plantarum*) expuesto a condiciones aeróbicas durante 7 días, lo que indica que el ensilado de pescado es un producto altamente estable bajo condiciones aeróbicas.

La licuefacción observada durante el almacenamiento del ensilado es debida principalmente, a las enzimas proteolíticas de las vísceras del pescado. La cual puede determinarse a través de su consistencia, que se reduce a medida que aumenta la hidrólisis y el contenido de nitrógeno soluble. También hay antecedentes que demuestran la utilización de jugo de frutas para acelerar la fermentación (Córdova *et al.*, 1990), también expresan que varios investigadores han utilizado las enzimas bromelina, extraída de jugo de piña (*Ananas comosus*) y la papaína de la papaya (*Carica papaya*) para digerir pescado. Córdova *et al.*, (1990).

Existe una correlación entre pH y el Nitrógeno no proteico, ya que a medida que disminuye el pH, se favorece la actividad proteolítica de ciertas enzimas (pepsina, tripsina), las cuales actúan sobre las proteínas del tejido muscular del pescado produciendo la hidrólisis. A medida que transcurre el tiempo (días), el ensilado se va tomando “más líquido”. Lo que está estrictamente relacionado con el proceso de solubilización de las proteínas y el proceso de licuefacción, consecuentemente a la par del mismo, el nitrógeno comienza a ser soluble (Bello, 1993).

Como resultado de la acción microbiana y a las reacciones de autólisis, se forman compuestos que son ampliamente utilizados en la determinación de la frescura de pescado, es el caso de la producción y aumento del Nitrógeno amoniacal, que a su vez se ve afectado por el almacenamiento (González y Marín, 2005). Esto se atribuye a la actividad bacteriana sobre las proteínas de pescado, actuando sobre los aminoácidos y produciendo amonio. Huss, (1998), señala que el aumento de nitrógeno amoniacal está relacionado con

la autólisis del ensilado, ya que a medida que las enzimas degradan las proteínas, facilitan posteriormente la acción bacteriana (González y Marín, 2005). De ahí la importancia de monitorear el nitrógeno amoniacal en el proceso de ensilaje del pescado en la cima tropical, de esta manera poder determinar desde que día se puede utilizar de acuerdo al pH y nitrógeno como indicadores de descomposición.

El método fermentativo ha sido considerado preferible, especialmente en países tropicales debido a la viabilidad de fuentes de carbohidratos, condiciones favorables para el proceso de fermentación y bajo costo que este genera. Otras ventajas del método fermentativo son la baja digestión de la proteína y el no desarrollo de olor a rancio en el producto (Bustani, 2003).

Córdova *et al.* (1990) realizó pruebas de obtención de varios tipos de ensilado biológico concluyendo que la especie de pescado afecta la velocidad de producción del ensilado, siendo mayor en las magras, de igual forma, la adición de frutas y el mantenimiento del mismo a temperaturas superiores a las del ambiente.

La frescura inicial del pescado juega un importante papel en la velocidad de reducción del pH inicial. Esto se debe a que se establece un mecanismo de competencia entre las bacterias lácticas y los microorganismos descomponedores. A mayor carga microbiana inicial de organismos que participan en el deterioro del pescado fresco, mayor será la cantidad de bacterias lácticas que se deben inocular para asegurar un adecuado proceso. Igualmente cuando se utilizan las vísceras del pescado en la elaboración del ensilado, se está favoreciendo el fenómeno de hidrólisis, por la presencia de mayor cantidad de enzimas contenidas en las vísceras, pero paralelamente se está añadiendo una fuerte carga de microorganismos que es necesario inhibir rápidamente. En consecuencia es recomendable la utilización de pescados frescos y con vísceras para favorecer la velocidad del proceso de ensilado (Bello, 2004).

El aumento en la acidez del ensilaje se debe a los ácidos orgánicos producidos por los microorganismos presentes, siendo el ácido láctico el más abundante (León Álamo, 2003). El ácido producido favorece la acción de las enzimas, se reduce el pH a niveles que inhiben el desarrollo de las bacterias putrefactivas y patógenas, lo que resulta en un producto microbiológicamente seguro (Díaz, 2004).

2.3.3 PROCESO DE ELABORACIÓN DE ENSILADO

La elaboración de un ensilado biológico puede llevarse a cabo tanto a nivel artesanal como en escala industrial (una tonelada por día o más) (Poulter y Disney, 1982).

Las instalaciones que se utilizan para la elaboración de ensilado dependen del volumen de producción. Los equipos empleados para la etapa de trituración son: adaptación de equipos disponibles localmente como molino picador de coco, picadora de carnes convencional a tornillo con placas perforadas, molino de martillo desintegrador, bomba trituradora (Mutrator), etc. Este último equipo sirve como mezclador y es usado cuando se procesan pescados pequeños o sólo vísceras. La molienda del pescado debe realizarse eficientemente tanto para el proceso biológico como para el químico. Algunos autores señalan que el tamaño de partícula no debe ser mayor de 10 mm de diámetro. A su vez, se recomienda cortar el pescado de manera tal que las superficies interiores queden expuestas al medio ácido preservante y por lo tanto, elegir una cortadora que corte el pescado en segmentos transversales, manejada por un motor o manualmente. Para lograr este requerimiento, el equipo a utilizar para la trituración podrá ser de características muy distintas, según se trate de desmenuzar pequeños pelágicos o cabezas de gran tamaño y fuerte estructura ósea.

El mezclado del pescado molido con el inóculo y el substrato puede ser hecho en un tanque de concreto en el caso del biológico. El tanque de producción puede ser de cualquier tamaño y forma, pero resistente al ácido en el caso químico; los contenedores de acero usados para elaborar o transportar el ensilado requieren de un revestimiento de polietileno para prevenir la corrosión. Para manejar grandes cantidades son adecuados los tanques de concreto u hormigón revestidos. Es necesario que la mezcla se agite regularmente para asegurar uniformidad hasta su completa homogenización. El tamaño y el número de tanques dependen de la cantidad y tipo de la materia prima disponible. Los pescados grasos y el pescado fresco se licuan más rápidamente que los desperdicios. Por ejemplo, el ensilado elaborado a partir de desperdicios de pescado blanco fresco tarda dos días si la temperatura es de unos 25 °C, pero tardará unos 5 a 10 días si es de 15 °C. Dependiendo de la velocidad de producción deseada y de la temperatura ambiente, la planta puede estar provista de medios calefactores. (Windsor y Barlow, 1984).

En 1990, el Instituto Tecnológico Pesquero del Perú desarrolló una técnica de obtención de ensilado biológico a partir de residuos cocidos de pescado utilizando bacterias lácticas, el ensilado fue empleado como insumo para la alimentación de pollos y cerdos (Areche y Berenz, 1990; Berenz et al, 1994), el proceso requiere consumo de energía para la cocción de residuos y para la incubación de 40 °C durante 48 horas. Con el propósito de disminuir los costos de producción, Albrecht y Torpoco (2008) elaboraron ensilado mezclando residuos crudos de pescado:melaza:koji(soja inoculada con cepas de *Aspergillus orizae*, *Zigosaccharoomyces rouxii* y *Tetragenococcus halophylus*) en proporciones de 9:1:1 a 37°C de incubación, logrando alcanzar valores de pH < 4.5 en ensilados de residuos crudos de Jurel, Caballa y Machete, el pH < 4.5, fue mantenido desde los 15 hasta los 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (18-26°C), luego de ese periodo, aumentó el pH y el ensilado se descompuso. Posteriormente, con el propósito de disminuir costos se realizaron pruebas a nivel piloto utilizando koji, para elaborar ensilado con residuo crudo de anchoveta: melaza: koji (soja inoculada con Cepas de *A. orizae*) en las proporciones 10:1.5:1.0, un grupo de muestras de ensilado fue almacenado al ambiente y otro grupo a 40 °C por 96 horas, las muestras almacenadas al ambiente presentaron valores de pH cercanos a 4.5 a los 21 días, aumentando lentamente el valor de pH hasta los 90 días; el grupo que fue llevado a 40°C mantuvieron valores de pH < 4.5 desde los 3 a 90 días, Albrecht y Salas (2013).

2.3.4 VENTAJAS DEL ENSILADO BIOLÓGICO

Algunas de las ventajas principales del proceso de ensilado biológico en comparación con el ensilado químico son: ahorro económico porque se evita la compra de ácidos; fácil mantenimiento y reproducción del cultivo iniciador; además, es fácil el secado ya que el ensilado de pescado fermentado presenta menor contenido de humedad que el ensilado químico (Martin, 1996). Aunado a lo anterior, desde el punto de vista nutricional, la hidrólisis proteínica que resulta del ensilado de pescado fermentado es menor que en el ensilado producido por adición de ácido. Además, el proceso de fermentación ayuda a estabilizar la calidad del aceite en el producto, lo cual resulta más atractivo para los animales (Enes Dapkevicius y col., 1998; Kjos y col., 2001). Su manipulación es sencilla, sin los peligros y riesgos, su reducido costo de producción, la posibilidad de adicionar diversas cepas de bacterias ácido lácticas, el uso de melaza es fácilmente obtenida en el

país a un costo razonable, el tiempo de proceso reducido y un producto, incluyendo sabor y olor, más atractivo y apetecible (Bello, 1993).

La utilización de diferentes técnicas y materias primas utilizadas en la elaboración de los ensilados biológicos, muestran mucha divergencia en su composición (Padilla *et al.*, 1996). Por esta razón existen controversias entre autores sobre la eficiencia alimenticia; ya que hay quienes aseguran que la digestibilidad del ensilado es cerca del 100 % y la de la harina de pescado fluctúa entre 75 y 80% (Padilla *et al.*, 2000).

2.3.5 COMPARACIÓN DE ENSILADO Y HARINA DE PESCADO

En comparaciones de costos relativos de la producción del ensilado con harina pescado, se han observado ventajas muy importantes para el costo unitario de proteína para alimento balanceado, aún en países con altos costos internos. La producción de ensilado industrial compite favorablemente con harina de pescado, principalmente como resultado de una menor inversión de capital. Esto es porque el precio de una planta de ensilado biológico con equipo separador de aceite es aproximadamente la mitad del correspondiente a una planta de harina de pescado con la misma capacidad (Parin y Zugarramurdi, 1994). Balsinde *et al.* (2003) obtuvieron en su trabajo un ensilado biológico con humedad de 70% y con proteína de 16.9% señalando que “tiene las características bromatológicas adecuadas para ser utilizado en la sustitución de la harina de pescado en la elaboración de dietas para el camarón de cultivo”. Bello (1994) menciona que el ensilado biológico tiene un alto contenido proteico; similar a la harina de pescado; y puede ser utilizado como sustituto de la harina de pescado en la elaboración de raciones de alimentos concentrados, o directamente como un complemento en la alimentación animal. Parin y Zugarramurdi (1994) mencionan que el ensilado se usa del mismo modo que la harina de pescado en los alimentos para animales. Meire *et al.*, (2002) es factible de utilizar en la acuicultura y una adecuada fuente de proteínas en alimentos para peces. Nwanna (2003) concluye; basado en estimaciones del beneficio económico e índice de utilización de nutrientes; la harina producida de ensilado biológico puede remplazar efectivamente a la harina de pescado. Berenz (1994) señala que es factible de ser utilizado en formulaciones de alimentos para animales y es que se sabe que en muchos países donde no se procesa harina de pescado, los

ensilados han sido empleados como un sustituto de la misma, obteniendo buenos resultados.

El ensilado biológico al utilizarse en fresco en la elaboración de las dietas aporta agua, proporciona aceite de alta calidad por su contenido de lípidos y carbohidratos (Balsinde *et al.*, 2003); sin embargo Parin y Zugarramurdi (1994) mencionan que se requiere aproximadamente cuatro veces más ensilado para la misma entrada de proteína de la harina de pescado. Cifras más optimistas reportan que la relación de reemplazo del ensilado biológico (elaborado con residuos) por la harina de pescado en dietas de animales es de 3 a 1 (3 kg de ensilado por kg de harina), pero que si se tratara de un ensilado integral (usando todo el pescado como resulta en el proceso de harina de pescado), la relación es de 2 a 2.5 unidades de ensilado por unidad de harina (Balsinde *et al.*, 2003). En el ensilado deshidratado; con humedad menor al 10%; su porcentaje de proteína bruta aumenta significativamente a rangos de 35 a 45% (González y Marín, 2005). También se ha probado el secado conjunto (o co-secado) con harinas de soya y de plumas; solas o en combinación; para producir productos secos con composición química y balance de amino ácidos similares al de la harina de pescado (Parin y Zugarramurdi, 1994; Fagbenro *et al.*, 1997; Nwanna 2003).

2.3.6 USO DE ENSILADO

Los ensilados elaborados como subproductos de la industria pesquera son importantes ingredientes en la nutrición animal. Son usados para alimentar toda la clase de especies animales tales como rumiantes, cerdos, pollos, animales de pieles, peces y mascotas. La razón por el gran interés en los productos pesqueros para la alimentación animal es por su alto y valioso contenido proteína y grasa (aceite). La composición química del ensilado húmedo indica elevados tenores de agua (60-80%) y variables porcentajes de proteína bruta (12-19%) de elevado valor nutricional en ensilado biológico. Se considera que en los ensilados la grasa es un poco más estable a la oxidación que en los ensilados químicos.

Entre los factores más importantes en la producción animal se destaca la alimentación, que representa entre el 50 y 80% de los costos variables de producción (Berenz, 1994). El alto costo se debe en gran medida a que la mayoría de las fuentes proteicas son costosas (Díaz, 2004). El ensilaje de residuos de pescado ha sido utilizado exitosamente como suplemento proteico en dietas para rumiantes y no rumiantes donde hay poca disponibilidad de fuentes proteicas (Gonzales y Marín, 2005; Cordova et al., 1990; Hassan y Heath, 1996; León, 2003). Winter y Feltham, (1983) estudiaron la utilización de ensilaje de pescado como solución a la provisión de proteínas en las dietas de rumiantes. Estos autores han demostrado que tanto los bovinos de carne y lecheros así como ovinos, pueden degradar bien la proteína presente en el pescado ensilado. Además, el ensilaje de pescado puede incorporarse como sustituto de leche para ovinos sin tener efectos detrimentales sobre la salud y el desempeño productivo de los animales, luego de un periodo de adaptación inicial (Díaz, 2004; Winter y Feltham, 1983).

En Venezuela, se estudió la utilización de ensilaje de pescado como un sustituto alternativo de proteína en la dieta de pollos de engorde y este comparo satisfactoriamente con harina de pescado, (Bello, 1994). Mediante pruebas de biológicas de aceptabilidad se observó que los pollos prefirieron las dietas con hasta cincuenta por ciento de inclusión de ensilaje. Además, los pollos alimentados con ensilajes de pescado registraron mayores aumentos en peso. Se encontró que un nivel de inclusión de 5 a 20% de ensilaje de pescado en dietas de pollos de engorde puede dar resultados similares a los obtenidos con la harina de pescado (Díaz, 2004; Bello, 1994).

En Dinamarca, el ensilaje de pescado se ha utilizado por más de 30 años como parte integral de concentrado o como suplemento proteico en aves y cerdos (León, 2003; Cordova *et al.*, 1990). En estudios con cerdos (Kjos, 2001) el aporte de 9% de la proteína dietética total en forma de ensilaje de pescado y no observo efectos negativos sobre el crecimiento corporal, las características de la canal, ni la calidad de carne. Asimismo, (Kjos *et al.*, 2000) estudio el efecto de inclusión de ensilaje de pescado en la dieta sobre el desempeño y la calidad de la carne de pollos parrilleros y encontraron que dicha inclusión puede ser llevada hasta niveles correspondientes al 21% de la proteína total, observándose resultados positivos. En adición señalaron que niveles altos de grasa en el pescado ensilado

puede causar un incremento deseable en los niveles de ácidos grasos poli-insaturados omega 3 en las pechugas y en la grasa abdominal de los pollos. La utilización de ensilaje de pescado con alto contenido de grasa habrá de aumentar los requerimientos dietéticos de antioxidantes de los pollos parrilleros.

En puerto Rico ya se han desarrollado metodologías para la fermentación anaeróbica de residuos de pescado y de lodos las industrias atuneras (Díaz, 2004). Lodos fermentados han sido evaluados como fuente de proteica en dietas para tilapias sin afectar la utilización de alimento, crecimiento, composición corporal; y como parte integral en dietas para cerdos, concluyendo que tiene potencial alimenticio (León, 2003).

Los estudios realizados con 30 becerros durante 90 días, alimentados con una dieta complementaria de 2 kg diarios, a base de harina de soya, harina de maíz, sal y minerales suplementada con ensilado biológico de pescado (0, 100, 200 y 300 g como materia seca por día), indicaron un incremento en peso vivo mayor en los animales suplementados con 100g de ensilado por día. A pesar de estos resultados se hace necesario ampliar los estudios en rumiantes (Bello, 1993). Los estudios con otras especies, Winter y Fetham, (1983), encontraron que la utilización de ensilaje de pescado en la alimentación de animales destinados a la producción de pieles debe ser limitada, debido a que visones y las zorras son muy sensibles a las dietas acidas con PH menores de 5.8. Estos autores recomendaron la utilización de ensilaje de pescado a niveles dietéticos de 10 a 30% en base seca durante el periodo decrecimiento, pero este uso debe suspenderse durante el periodo de apareamiento (Díaz, 2004). La posible utilización de estos residuos pesqueros fermentados como suplemento proteico para diversas clases de animales resultaría beneficiosa tanto para la industria de la pesca como para agropecuaria, reduciendo a la vez los problemas de contaminación ambiental y disposición de residuos sólidos (Díaz, 2004).

CAPITULO III

MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 MÉTODO DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

La determinación de mohos fue realizada en el laboratorio LABS-ITP, acreditado según la ISO-IEC 17025:2005, se siguió el método de Numeración de Mohos y Levaduras FDA/BAM Online 8th Ed. Rev. A/1998. April 2001 - Chapter 18. Este ensayo fue realizado al koji con papa, koji con cebada y koji con arroz, la melaza y el ensilado.

Así mismo, se realizó el análisis de numeración de microorganismos aerobios mesofilos en la melaza, residuo y los respectivos ensilados según Aerobic Plate Count A-D. FDA BAM. January 2001. Edition 8 Revision A. 1998. Chapter 3.

3.1.2 ANÁLISIS QUÍMICO

3.1.2.1 Composición Proximal

La composición proximal fue determinada de acuerdo a los métodos analíticos según la FAO (1986), se determinó proteína, grasa, ceniza y humedad.

3.1.2.2 pH

El pH se determinó por lectura directa, utilizando un electrodo Blueline 21PH, marca Schott para muestras semisólidas acoplado a un potenciómetro Schott de Alemania, se emplearon soluciones buffer de calibración de pH 4.0, 7.0 y 9.0, trazables a Nist.

3.1.2.3 Acidez

Para la determinación del % de acidez, se siguió el método 947.05 AOAC (2006).

3.1.2.4 Histamina

Para la determinación de la histamina se siguió el método de la Norma Chilena Oficial NCh 2637. 2001, utilizándose un HPLC Perkin Elmer, modelo series 200, con detector UV, para la curva de calibración se usó estándar de histamina diclorhidrato de la marca Sigma.

3.1.3 ANÁLISIS SENSORIAL

Las características del atributo olor fueron evaluadas de acuerdo a una escala de 1 a 5 puntos, la cual fue establecida con pruebas preliminares, las calificaciones se muestran en el cuadro xx.

Cuadro 4. Evaluación de olor en el proceso de fermentación

DESCRIPCION	CALIFICACION
Olor a pescado, moderado a frutas fermentadas	5
Olor moderado a pescado y leve a fermentado o frutas	4
Olor a pescado intenso, ausencia de deterioro y a melaza	3
Inicios de olor de pescado en descomposición, azufrado, muy rancio	2
Olor a pescado a pescado descompuesto.	1

El producto fue calificado como aceptable si presentaba calificaciones mayores o iguales a 3. En el presente trabajo la calificación inicial de los ensilados correspondía a 3 puntos.

3.2 ANALISIS ESTADÍSTICO

Para la determinación de las condiciones óptimas de incubación en los diferentes sustratos se aplicó la metodología de superficie de respuesta (MSR) con diseño compuesto central rotatable, con el software Minitab versión 15; el diseño consideró 5 niveles para cada factor.

Se usó el software SPSS versión 19 para el análisis de regresión y varianza de la variable dependiente histamina con 2 factores: tiempo y tratamiento. Se aplicó el ANOVA de 1 factor y la prueba de Duncan para comparar la formación de histamina entre los tratamientos de ensilado, a un nivel de confianza $\alpha = 0.05$.

3.3 PREPARACIÓN DE INOCULO

3.3.1 CRECIMIENTO DEL KOJI

El koji es una mezcla de soja cocida y trigo, con *Aspergillus orizae*, con límite de mohos de 10^6 UFC/g; levaduras 10^3 UFC/g y bacterias mesófilas aerobias 10^3 UFC/g (Kikko, 2015).

3.3.1.1 Ta: CEBADA

Se pesó 1 kg de cebada, se retiró las piedritas o arenas, cocinar, solo hasta que esté un poco blanda, enfriar. Pesar 900 g cebada colocarlo en una fuente y agregar 100 g de koji.



Figura 5. a) Cebada en cocción b) Koji crecido en cebada luego de 48

Cuadro 5. Diseño experimental para la cebada

TIEMPO (Horas)	TEMPERATURA (°C)				
	25°C	30	35	40	45
12			X		
24		X	XX	X	
36	X				X
48		X		X	
60			X		

3.3.1.2 Tb: PAPA

Se peso 900 g de papa frío previamente cocinado colocarlo en una fuente y agregar 100 g de koji.

Se mezcló y expandirlo en la fuente cubrirlo con bolsa dejando espacio entre la superficie de la papa y la bolsa y llevarlo a 26 °C durante 48-50 horas.



Figura 6. a) Papa koji crecido 24h b) Koji crecido 48h

Cuadro 6. Diseño experimental para la papa

TIEMPO (Horas)	TEMPERATURA (°C)				
	20	25	30	35	60
24			X		
36		X		X	
48	X		XX		X
60		X		X	
72			X		

3.3.1.3 Tc: ARROZ

Se pesó 1500g de arroz, no lavar, agregar aproximadamente 1500ml (1.5 Litros) de agua y cocinar, enfriar.

Se pesó 2500 g de arroz cocido frío, colocar en una fuente y agregar 250 g de koji. Mezclar, expandir y cubrirlo con bolsa dejando espacio entre la superficie del arroz y la bolsa llevarlo a 26 °C durante 48-60horas.

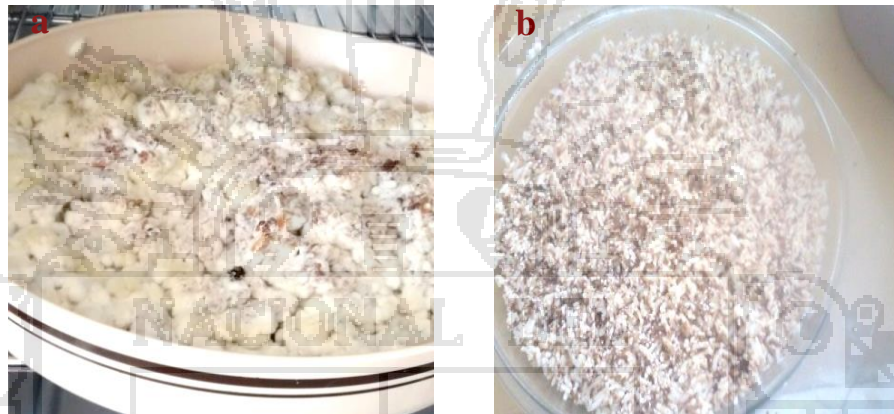


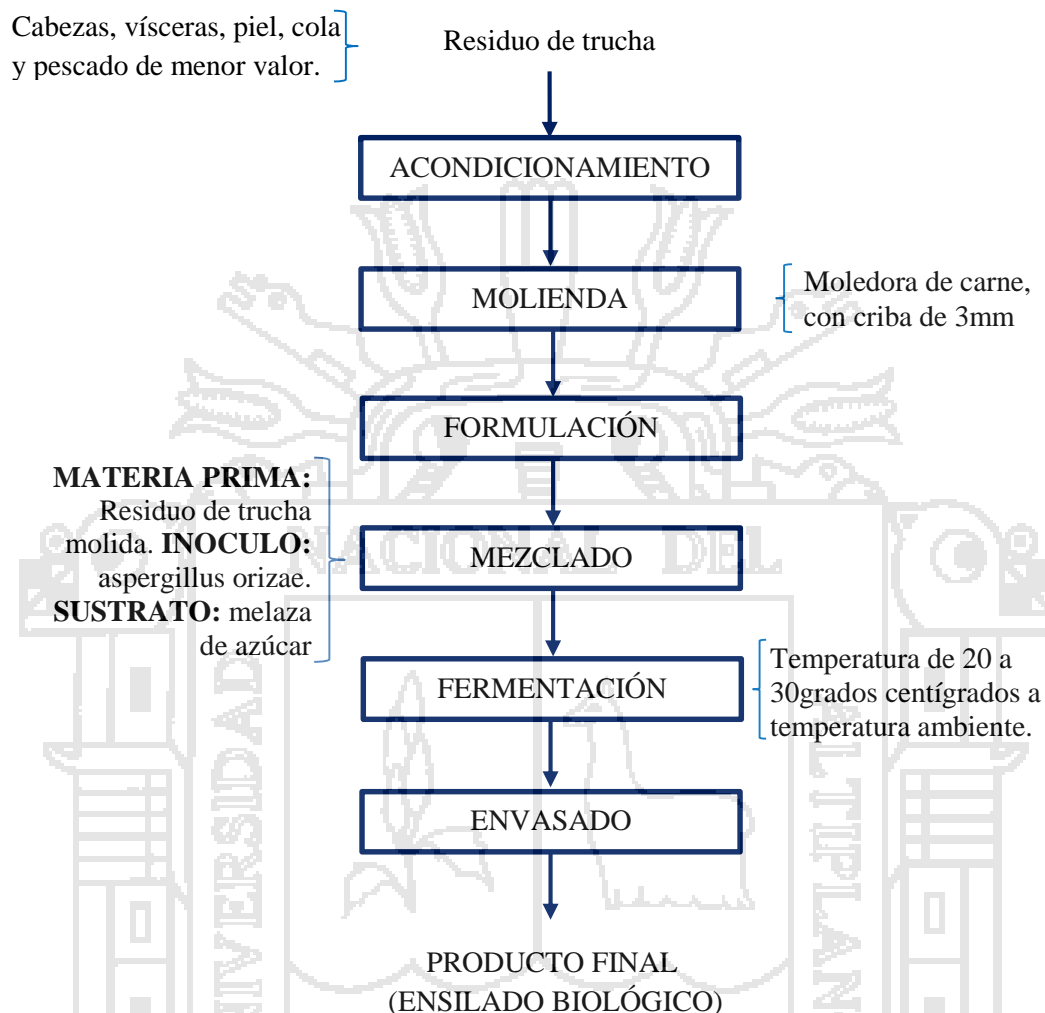
Figura 7. a) Koji crecido en arroz 24 h b) Koji crecido luego de 48h

Cuadro 7. Diseño experimental para el arroz

TIEMPO (Horas)	TEMPERATURA (°C)				
	20°C	30	35	40	48
12			X		
24		X	XX	X	
36	X				X
48		X		X	
60			X		

3.4 ELABORACIÓN DE ENSILADO

3.4.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE ELABORACIÓN DE ENSILADO BIOLÓGICO



3.4.2 MATERIA PRIMA

Se utilizaron los residuos de trucha(cabeza, vísceras , espinazos, pellejo y otros) y trucha en mal estado o de bajo valor comercial que no pueden ser consumidas directamente; residuos que provienen despues de haber efectuado operaciones preliminares del fileteado de trucha con piel, se considero el estado recomendable de fresca de los residuos puesto que mientras mejor es el estado de fresca, mejor calidad de producto se obtendra. Procesos realizados por Planta de Tranformacion de trucha ARAPA San Pedro y San Pablo SAC (ARAPA SAC).

3.4.3 RECOLECCIÓN

Una vez almacenado los residuos en el almacén de residuos, en baldes o bolsas plásticas, se transportó desde la planta de transformación de trucha hasta el punto de acopio final.

Punto de elaboración y almacenado de ensilado biológico fue en el Laboratorio de proyecto: “Implementación de una técnica de ensilado biológico en los residuos crudos de trucha como un insumo para la elaboración de dietas balanceados de alta digestibilidad y de bajo costo, para la alimentación de ganado en Puno”.

3.4.4 MOLIENDA

Una ves efectuada la recoleccion y pesaje, los residuos se procedieron a una molienda en una moledora de carne, cuyo diametro fue de 3mm, obteniendose finalmente una pasta homogenea, que asegura un mayor contacto y actividad de *Aspegillus orizae* y de melaza de caña, en la superifice de la pasta.

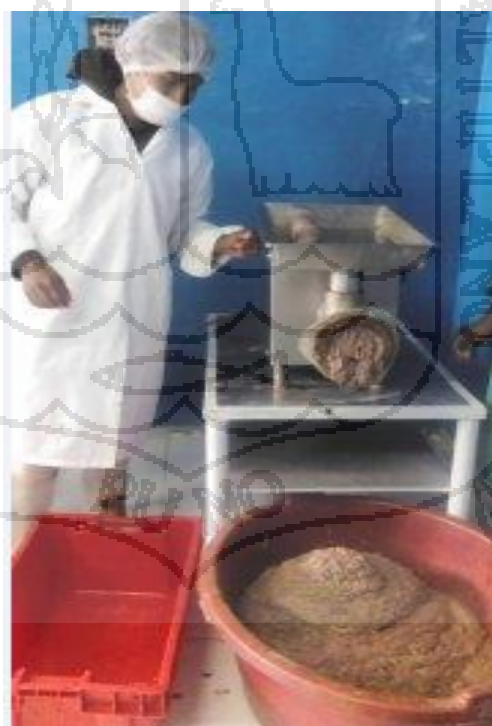


Figura 8. Molienda de residuos de trucha

3.4.5 FORMULACION DE LA MEZCLA

Las cantidades de sustrato, inóculo y residuo son indudablemente determinantes para obtener ensilado biológico con un nivel de pH y acidez. Por eso es importante encontrar un porcentaje adecuado de cada componente de mezcla, que satisfaga todos los requerimientos deseados

Cuadro 8. Formulaciones de los ensilados n=3

TRATAMIENTO	FORMULACIONES		
	Residuo triturado (Kg).	Carbohidrato (Melaza en gramos)	Koji crecido (g)
T1	3,00	450 g melaza	300g crecido en papa
T2	3,00	450 g melaza	300 g crecido en arroz
T3	3,00	200 g melaza	550 g crecido en arroz
T4	3,00	450 g melaza	300g crecido en cebada



Figura 9. a) Residuos triturados b) y c) Preparación de formulaciones

3.4.6 MEZCLADO

Una vez pesado los componentes del ensilado biológico: pasta de residuos de trucha, sustrato (melaza de caña) e inóculo (*Aspergillus oryzae* crecido en koji), los componentes han sido incorporada al recipiente de mezclado en el siguiente orden: pasta de residuos, sustrato e inóculo; previo a la adición de sustrato e inóculo, se controló el pH de la mezcla, el mezclado se realizó manualmente hasta

lograr un mezclado homogéneo, se codificaron los baldes con tapa hermético en cada balde de tal manera que no entre ningún insecto, creando un espacio vacío de 25% a fin de evitar rebosamiento por la formación de gases durante la fermentación.



Figura 10. Mezcla de residuos de trucha molida, melaza, koji crecido en sustrato

3.4.7 FERMENTACION

Para llevar a cabo este proceso se hizo a temperatura ambiente. Se colocó los baldes en los lugares establecidos y durante el tiempo que se registre temperaturas cercanas a 26 °C. Se registró el pH, el porcentaje de acidez y el olor de cada uno de los baldes cada 24 horas.



Figura 11. Control de la temperatura y del PH en el ensilado

3.4.8 ENVASADO

El ensilado biológico se envaso en baldes plásticos en presentaciones de 15 kilos.

3.4.9 ALMACENAMIENTO

Cuando el ensilado llegó a pH 4.5, fue almacenado en un ambiente fresco ventilado, seco sin caída de rayos solares, a temperatura ambiente (10°C) con fines de mejor conservación, durante este proceso final se determinó la estabilidad de pH y acidez del ensilado biológico, para determinar vida útil.

3.4.10 VIDA ÚTIL

Se determinó vida útil por 93 días, teniendo como indicadores la estabilidad de pH, acidez, olor e histamina del ensilado biológico.

pH: Según Bello (1997), el pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlado durante todo el proceso y almacenamiento del ensilado biológico de pescado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad del ensilado y manifiesta cualquier cambio que pueda afectar el producto. Fagbenro y Jauncey (1995) citaron que la estabilidad de ensilado biológico se obtiene con

valores de pH menores que 4,5. Dicho valor muestra la fase o fenómeno de acidificación por parte de los microorganismos.

Acidez: Este comportamiento está propiciado por la propia metodología de elaboración, donde en el ensilado biológico acidez dependerá de la adición de las bacterias inoculadas y la fuente de carbohidratos empleada.

Olor: Según comentarios realizados por Pérez y Col., (1997), los olores desagradables son muy propensos en las conservaciones de pescados y mariscos al ser alimentos proteicos muy putrescibles, cuando no pueden ser conservados correctamente en refrigeración o cuando no se tienen adecuados preservantes, ya que contienen una flora bacteriana normal, que unida a los contaminantes que se agregan al capturarlos y manipularlos, invaden la piel y la carne con gran rapidez, produciendo sustancias que ocasionan alteraciones del olor.

Histamina: La histamina es una amina biógena proveniente de la descomposición de histidina libre. La determinación de histamina en la harina proporciona un índice bastante correlacionable con el grado de deterioro de la materia prima. También, es un índice de frescura de los solubles incorporados, ya que la histidina y la histamina son compuestos de alta solubilidad en agua y gran parte de estos componentes se separan con el agua de cola luego del prensado del pescado. Por esta razón, el contenido de histamina será menor en una harina en la que no se hayan adicionado los solubles de pescado que en una harina completa (Tanikawa, 1985). Esta determinación es también de importancia por los efectos patógena que puede producir la histamina en los animales que consumen dosis importantes en sus dietas.

Toxicidad de la histamina:

La intoxicación por histamina está asociada con el desarrollo de reacciones alérgicas y la severidad de la intoxicación está relacionada con la cantidad de esta amina ingerida, la sensibilidad del consumidor y se cree que también podría influir la presencia de otros compuestos generados por acción bacteriana, que actúan como "potenciadores de toxicidad". Entre los posibles potenciadores están la trimetilamina, el óxido de trimetilamina y otras aminas biógenas (Alberecht Ruiz y

Salas Maldonado, 2013). Todavía no se ha establecido la dosis tóxica mínima de histamina para humanos, pero en la mayoría de los casos el nivel encontrado en pescados asociados a esta intoxicación es por encima de las 200 ppm y más comúnmente por encima de 500 ppm (Yeannes, 1995; Alberecht Ruiz y Salas Maldonado, 2013 Respecto a la harina de pescado, los valores de histamina superan las 1000 o 1500 ppm, en una harina común, mientras que una harina de alta calidad contiene menos de 500 ppm de histamina (Zaldívar, 1992; Díaz, 1996). Sin embargo, al evaluar el contenido de histamina en una harina, es importante considerar el aporte de esta en la masa total del alimento a consumir; así la harina de pescado que aporta un 10% en la preparación de un alimento balanceado, sólo aportará un décimo en la dieta del animal que la consuma. Es decir que, si la harina contiene 250 ppm de histamina, el alimento tendrá sólo 25 ppm (Alberecht Ruiz y Salas Maldonado, 2013). Por otro lado, si bien hay una relación directa entre la aparición de la intoxicación y la presencia de altas concentraciones de histamina, aún no se conoce con precisión el agente causal en sí de esta intoxicación y considerar la histamina como único indicador de toxicidad no resulta arbitrario, ya que existen otras aminas biógenas y aún más tóxicas que la histamina e incluso una determinada amina biógena puede tener distinta acción sobre una especie y otra, por ejemplo, la histamina puede ser más tóxica en la alimentación de peces que en la de cerdos (Zaldívar, 1992).

CAPITULO IV

ÁREA DE INVESTIGACIÓN

4.1 LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente proyecto de investigación se realizó en la planta de proceso de trucha, en el centro de investigación y producción pesquera EMPRESA Industrial ARAPA SAN PEDRO Y SAN PABLO S.A.C. que se encuentra ubicado en la comunidad campesina de Iscayapi km 04 carretera Arapa- Chupa en el distrito de Arapa, (ubicado a 105 km. de la ciudad de Puno) provincia de Azángaro departamento de Puno, Perú.

Y en los laboratorios acreditados de Instituto Tecnológico de la Producción - ITP es un Organismo Técnico Especializado (OTE), adscrito al Ministerio de la Producción.

Condiciones Ambientales. El clima de la zona de ejecución de proyecto es frío y seco, como lo es en todo el altiplano, registrándose temperaturas nocturnas por debajo de 0 °C, principalmente en los meses de invierno (Mayo - Julio); las temperaturas diurnas Varían entre 13 a 21 °C. El régimen de lluvias tiende a concentrarse entre Diciembre y Marzo, con mayor incidencia en el mes de febrero.

La prueba de investigación se desarrolló en los siguientes lugares.

- Laboratorio de microbiología y físico química de Instituto Tecnológico de Producción (ITP).
- En laboratorio de ensilado de la empresa Arapa SAN PEDRO Y SAN PABLO S.A.C. implementado por el Proyecto:” Implementación de una técnica de ensilado biológico en los residuos crudos de trucha como un insumo para la elaboración de dietas balanceados de alta digestibilidad y de bajo costo, para la alimentación de ganado en Puno, financiado por INNOTAVATE PERU, ITP y la empresa ARAPA SAC.
- Planta de transformación y producción de truchas ARAPA SAC.
- Planta de producción de piensos de ARAPA SAC.

4.2 MATERIAL Y EQUIPOS

4.2.1 MATERIAL EXPERIMENTAL

Para elaborar ensilado biológico.

- ✓ Residuos de trucha (cabeza, vísceras, piel, espinazo, etc.).
- ✓ Trucha entera descartada, posiblemente muerta por *flavobacterium*.
- ✓ Arroz, papa y cebada.
- ✓ Koji: Cultivo preparado por el crecimiento de *Aspergillus orizae* en una mezcla de soya cocida y trigo tostado en un lugar cálido y húmedo. Las esporas de este hongo cuando están maduras son de un color verde pálido, el koji es de alto contenido de enzimas como proteasas, amilasas, celulasas, lipasas entre otras. También presenta levaduras del genero *Saccharomices*.
- ✓ Melaza comercial.

4.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- ✓ Balanza pedestal electrónica. Marca: OHAUS, Modelo: T 32 XVV
Capacidad: de 150 kg.
- ✓ Balanza gramera electrónica. Capacidad de 0,0001g a 3kg.
- ✓ Marca: OHAUS, Modelo: SPJ 6001. Serie N° B345959084
- ✓ Incubadora mod. IN 75, Capacidad aproximada 74 Lt. “MEMMERT”
ALEMANIA
- ✓ Potenciómetro (PH – metro) MOD. LAB-850. “SCHOTT” ALEMANIA.
Estándares de pH 4, 7, 9.
- ✓ Licuadora OSTER original de 3 velocidades COUNTER modelo BRLY07-
Z00, con tecnología de motor reversible.
- ✓ Moledora de carne TK-32^a, Modelo MLC 032 S/N 18123. Acero inoxidable.
- ✓ Moledora de grated c/ motor 2 NP. INOX.
- ✓ maquina selladora al vacío ORBET, con tablero de control de diferentes
parámetros c/ tableros de base, con motor. Marca “INNE”. Modelo: VM-20
- ✓ Balanza plataforma capacidad 500 kilos. Marca “ONDOR”. Modelo 4000.

- ✓ Congeladora de dos tapas, capacidad 520kg. Marca “ELECTROLUX”.
Modelo EC522 NBHW
- ✓ 02 picetas
- ✓ Vasos precipitados de 100ml
- ✓ 6 termómetros de 0 a 100 °C.
- ✓ Bureta de 25 ml.
- ✓ 3 cronómetros.
- ✓ Pipetas volumétricas de 100ml. “KIMAR”
- ✓ Pipetas volumétricas de 10ml. “KIMAR”.
- ✓ Placas Petri.
- ✓ Erlenmeyer aforado de 250 ml. “KIMAR”.
- ✓ Tubos de ensayo “PYRIX”.
- ✓ Probetas graduadas de 10, 100, 200, y 500 ml. “PYRIX”. Marca “DURAN”.
- ✓ Portatubos.
- ✓ Gradillas
- ✓ Fiola pírrex de 100 y 500ml.
- ✓ Baguetas
- ✓ Soportes
- ✓ Equipo de digestión.
- ✓ Balón de digestión.
- ✓ Vasos de precipitación aforados de 250ml. “KIMAR”.
- ✓ Jarras de plástico graduados “DURAPLAST”.
- ✓ 30 Baldes de plásticos de 15 Lt. con tapa “DURAPLAST”.
- ✓ 24 Baldes de plástico de 25 Lt. con tapa “DURAPLAST”
- ✓ 10 Bidones de plástico de 100kg.
- ✓ Bolsas de plásticos de doble densidad.
- ✓ Papel filtro Whatman N° 02.
- ✓ Equipo de extracción SOXHLET.
- ✓ Equipo de destilación micro-KJEDAHL.
- ✓ 3 mesas pequeña tablero de INOX 0.60 x0.4 m con 4 ruedas
- ✓ 9 platillos INOX
- ✓ Ollas, cocina a gas.
- ✓ Cuchillos inox.
- ✓ Tableros.

- ✓ Cucharas inox.
- ✓ Bandejas para incubación *Aspergillus Orizae*.
- ✓ Guantes quirúrgicos
- ✓ Barbijo descartable
- ✓ Gorras descartables
- ✓ 4 Tinajas de plástico, capacidad de 30 l. “DURAPLAST”.
- ✓ 16 Jabas plásticas.
- ✓ 4 canastillas, capacidad de 40kg. “DURAPLAST”
- ✓ 6 Parihuelas de pastico.
- ✓ Mesas y sillas de trabajo

4.2.3 REACTIVOS

- Solvente orgánico (Éter-di etílico) para determinar la grasa total.
- Ácido sulfúrico concentrado para determinar proteína.
- Sulfato de potasio como catalizador.
- Solución de ácido bórico al 1% como indicador de la acidez titularle.
- Hidróxido de sodio a 0,01N para la titulación de acidez.
- Ácido clorhídrico al 0,02N para determinar de proteínas.
- Azul de bromofenol.
- Electrodo blueline 21 PH sin sensor de temperatura.
- Solución patrón PH 4. “SIGMA ALDRICH” Alemania.
- Solución patrón PH 7. “SCHARLAU”. España.
- Solución patrón PH 9. “SCHARLAU” España.

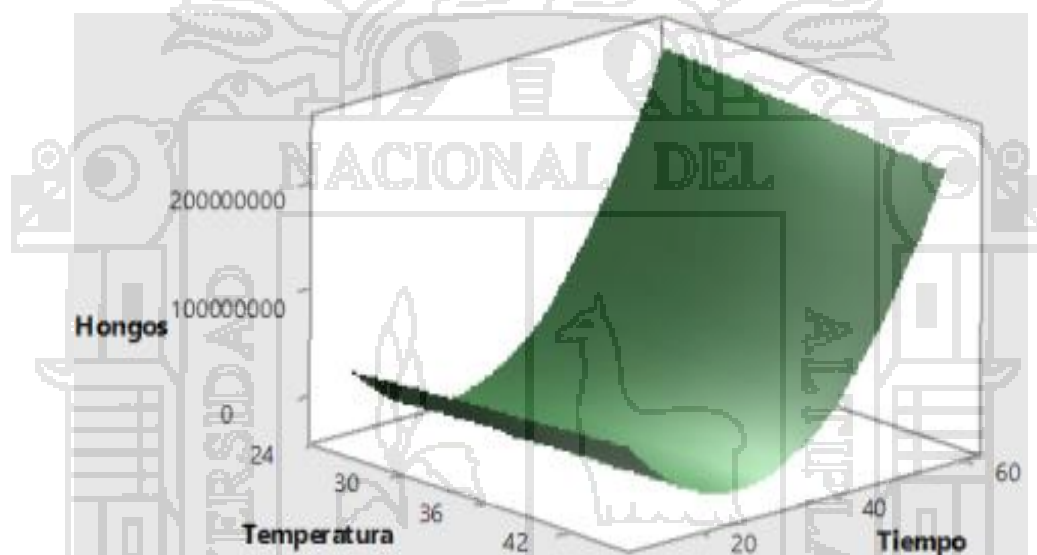
CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSION

5.1 CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS ORIZAE*

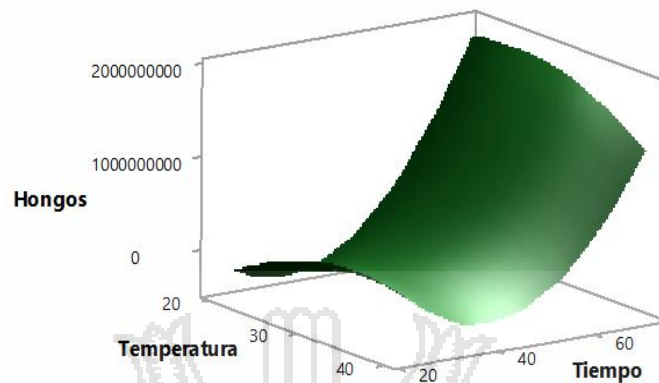
Las predicciones del tiempo y temperatura recomendado se observan en las figuras 12, 13 y 14, para la cebada, papa y arroz respectivamente.

Figura 12. Efectos de tiempo y temperatura en el crecimiento del *A. orizae* en Cebada.



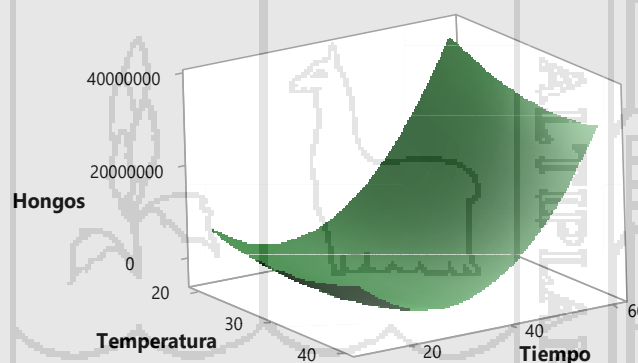
En la figura 12, se muestran efectos de tiempo y temperatura, según método superficie respuesta de crecimiento de *Aspergillus orizae* en cebada se recomienda la incubación a 25°C durante 60 horas, a estos parámetros se observa mayor crecimiento de hongo.

Figura 13. Efecto de tiempo y temperatura en el crecimiento del *A. orizae* en papa



Según el método superficie respuesta para papa se recomienda la incubación a una temperatura de 25°C durante 62 horas, para lograr el mayor crecimiento del *Aspergillus orizae*.

Figura 14. Efecto de temperatura y tiempo en el crecimiento del *A. orizae* en arroz



Según el método superficie respuesta de figura 14, para arroz se recomienda la incubación a 25 °C durante 60 horas, para lograr el mayor crecimiento del *Aspergillus orizae*.

Discusión:

Los resultados de tiempo y temperatura óptimos de crecimiento del *Aspergillus orizae*, encontrado en el presente proyecto de Investigación se encuentran cercanos al tiempo (46 – 60 h) y a la temperatura (25 y 32 °C); el cual es similar reportado por Bechman *et al.* (2012) quien reporto que el *Aspergillus orizae* tiene el mayor crecimiento y actividad α -amilasa.

Cuadro 9. Tiempo y temperatura sugeridos por el diseño compuesto central para la optimización del crecimiento de koji en cebada, papa y arroz

N° Experimento	CEBADA		PAPA		ARROZ	
	Temperatura (°C)	Tiempo (Hora)	Temperatura (°C)	Tiempo (Hora)	Temperatura (°C)	Tiempo (Hora)
1	25	36	20	48	20	36
2	30	24	25	36	25	24
3	30	48	25	60	25	48
4	35	12	30	24	30	12
5	35	36	30	48	30	60
6	35	36	30	48	30	36
7	35	60	30	72	35	24
8	40	24	35	36	35	48
9	40	48	35	60	40	36
10	45	36	40	48		

Cuadro 10. Conteo de hongos en UFC/g según la tiempo y temperatura de incubación establecida en el cuadro 8 para cebada, papa y arroz

ENSAYO	CEBADA	PAPA	ARROZ
	(ufc/g)	(ufc/g)	(ufc/g)
Recuento de Hongos			
1	11x10 ⁵	20 x10 ⁶	44x10 ⁵
2	40 x10 ⁴	25 x10 ⁵	21x10 ⁴
3	18 x10 ⁶	25 x10 ⁷	61x10 ⁵
4	10 x10 ⁴	70 x10 ³	70x10 ⁴
5	10 x10 ⁶	30 x10 ⁷	36x10 ⁶
6	10 x10 ⁶	48 x10 ⁷	17x10 ⁵
7	29 x10 ⁷	23 x10 ⁸	88x10 ⁵
8	40 x10 ⁴	30 x10 ⁵	42x10 ⁴
9	70 x10 ⁵	225 x10 ⁵	15x10 ⁵
10	10 x10 ⁴	14 x10 ⁶	

Los conteos de Hongos son mostrados en el Cuadro 9. El software reportó que las tiempo y temperatura de incubación optimizados fueron 25 °C y 60 h; 26° C y 62 h; 25°C y 60 h, para cebada, papa y arroz respectivamente y desarrollado en la figura 12, 13 y 14.

5.2 FORMULACIONES DE ENSILADO BIOLÓGICO

Resultados: Se plantearon formulaciones para el procesamiento de ensilados usando 3 insumos:

- ✓ Residuos generados del procesamiento de filete de trucha, trucha eviscerada, filete de trucha ahumada; consta de cabeza, aletas, cola, espina dorsal, vísceras y trucha de menor de valor.
- ✓ Melaza con 0.74 ± 0.4 % de nitrógeno, Humedad 29.8 ± 0.1 %; cenizas 11.3 ± 0.1 %, pH 5.45; 73.5 °Brix.
- ✓ Koji en arroz, Koji en papa blanca y koji en cebada; incubados al tiempo y temperatura óptima.

Se desarrollaron 4 formulaciones:

Cuadro 11. Formulación de ensilados de residuos de trucha n=3

TRATAMIENTO	FORMULACIONES		
	Residuo triturado (Kg).	Carbohidrato (Melaza en gramos)	Koji crecido (g)
T1	3,00	450 g melaza	300g crecido en papa
T2	3,00	450 g melaza	300 g crecido en arroz
T3	3,00	200 g melaza	550 g crecido en arroz
T4	3,00	450 g melaza	300g crecido en cebada

Discusión:

En el cuadro 11 se observa que la cantidad de melaza y koji crecido en diferentes carbohidratos empleado para T1, T2 y T4 fueron similares a diferencia de T3. Los tiempos de fermentación para los T1, T2 y T3 fueron por 93 días, mientras que el T4 se eliminó a los día 11 al iniciar el proceso de putrefacción es probable que las bacterias de descomposición hayan proliferado generando aminas, aumentando el pH del ensilado y posiblemente también la temperatura haya influenciado en el desarrollo de *Aspergillus orizae* para inicio de fermentación. Mientras que el T3 no llegó a los valores deseados posiblemente se deba a que éste tratamiento se realizó con menor cantidad de melaza en comparación con los demás tratamientos, es probable que haya sido insuficiente la cantidad de melaza para que el *Aspergillus orizae* pueda generar mayor cantidad de ácido; los resultados difieren en comparación según reportado por Vásquez et al. (2011) elaboro ensilado biológico a nivel de laboratorio con glucosa, a partir de residuos viscerales (estomago e intestinos) de pez espada, raya y tiburón, a 25 °C con 25 g de residuos triturados, 8 mL de glucosa y 2 mL del inóculo de bacterias lácticas, logrando un ensilado estable.

Los tratamientos T1 y T2, alcanzaron valores deseados de pH, olor y estamina es probable que la cantidad de melaza y temperatura óptima de fermentación hayan influenciado. Las cantidad de melaza empleado es similar con los reportados por los Spanopoulos, Ponce, Barba, Ruelas, Tiznado, Hernández y Shirai (2010) emplearon proporción de melaza de 12%, 15 %, 20 % y 25 % respectivamente. Obteniendo el valor inicial de pH fue de 6.94 y disminuyó hasta 4.53 a las 96 horas en las inclusiones de melaza de 20 y 25 % y de 4.63 y 5.00 en los niveles de 15 y 12 % respectivamente. Según Raa (1982) establece que se requiere mínimo 10 % de melaza y otros trabajos han reportado el empleo de 15 % de melaza (Bello, 1994, Nwanna, 2003; Vidotti, 2003; González y Marín, 2005 y Toledo-Pérez, 2007). Fagbenro y Juncey (1995), a diferencia de otros autores empleo 5% melaza, aunque posteriormente los mismos autores aplicaron la misma fuente de carbono en una concentración de 150 g/Kg, adicionando 5 ml/Kg de *Lactobacillus plantarum*. Albrecht y Torpoco (2008) elaboraron ensilado con 9.1% de melaza por 15 días a 37° C y 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente

(18 a 26°C), luego de ese periodo aumento, el pH y el ensilado se descompuso. También, Albrecht y Salas (2013), reportaron que usaron 12% de melaza, el ensilado fue almacenado al ambiente y otro grupo a 40 °C por 96 horas, las muestras almacenadas al ambiente presentaron valores de pH cercanos a 4.5 a los 21 días, aumentando lentamente el valor de pH hasta los 90 días; el grupo que fue llevado a 40°C mantuvieron valores de pH < 4.5 desde los 3 a 90 días. Finalmente, (Fagbenro y Juncey, 1998) reportan que la melaza presenta ventajas por su menor precio y alto contenido de azúcares solubles. Además, presenta capacidad ligante, y mejora la estabilidad y características sensoriales del ensilado y los alimento en los cuales es incluido.

5.3 VIDA ÚTIL DE ENSILADO BIOLÓGICO

Los indicadores empleados fueron los valores de pH se muestra en el anexo Cuadro 17, olor anexo cuadro 18, acidez e histamina.

5.3.1 PH

Resultados y discusiones:

Según bello (1997), el pH es uno de los índices de mayor importancia que debe ser controlada durante el proceso y almacenamiento del ensilado biológico de pescado, ya que refleja el desarrollo del proceso, la calidad de ensilado y manifiesta cualquier cambio que pueda afectar el producto. Anteriormente, Fagbenro y Jauncey (1995) citaron que la estabilidad de los ensilados se obtiene con valores de pH menores a 4.5. Dicho valor muestra la fase o fenómeno de acidificación por parte de los microorganismos. González *et al* (2005), reporta que el valor de pH es un buen indicador del proceso de ensilado, valores de pH $\leq 4,5$ garantiza la estabilidad del ensilado. COVENIN (1979), establece que las harinas de pescado no deben presentar pH mayores a 5.

Los valores iniciales de pH de los residuos de trucha y del ensilado fueron 6.1 \pm 0.1 y 6.4 \pm 0.1, respectivamente, valor cercano al reportado por Albrecht y Salas (2013) para el inicio del proceso de ensilado (pH 6.47).

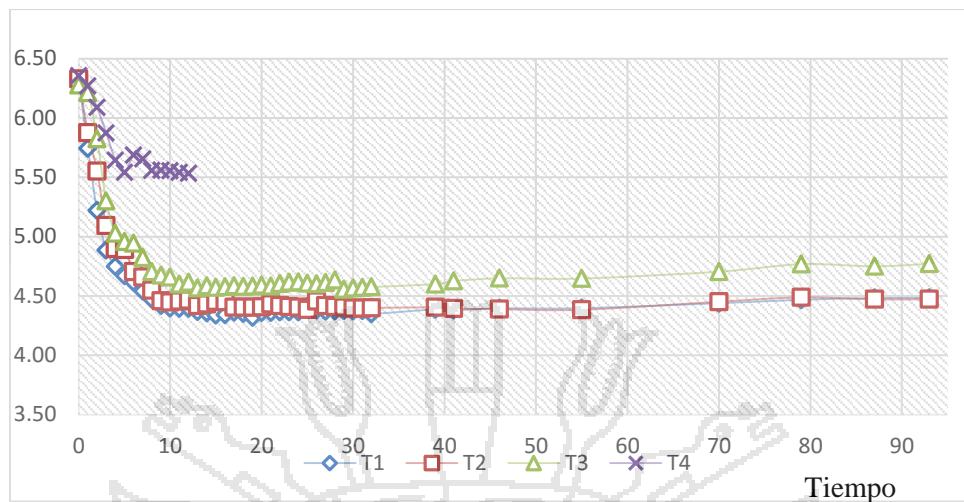


Figura 15. Influencia de los tratamientos (T1, T2, T3 y T4), del tiempo sobre el valor de pH

Los resultados presentados en la figura 15 y en el cuadro 17 de anexo, muestran que los tratamientos T1 y T2, donde se adicione mayor cantidad de melaza, los valores de pH alcanzaron a ≤ 4.5 a los días 9 de proceso de fermentación a temperatura ambiental (días soleados fue 18 a 30°C) de la Región de Puno, posteriormente fueron almacenados a 8-16°C hasta los 93 días, donde el pH se mantuvo constante; los cuales son similares en cantidad de carbohidrato empleado, temperatura de incubación y tiempo reportado por (Llanes, Toledo, Fernández y Lazo; 2007) citaron que la estabilidad y calidad de ensilado biológico con 10% de miel, a los días 7 de almacenamiento a 29-30°C observaron valores de pH entre 4.21 - 4.47 y con 15% de miel observaron pH de 4.12 - 4.41 a los días 10 de almacenamiento. Según; Spanopoulos, Ponce, Barba, Ruelas, Tiznado, Hernández y Shirai (2010) reportaron que el ensilado de atún presentó el efecto del porcentaje de melaza para la fermentación; el pH a las 96 horas disminuyó de 6.60 a 4.51, 4.55, 4.53 y 4.58 con melaza al 12, 15, 20 y 25% respectivamente y en ensilado de tilapia obtuvieron como valor inicial de pH 6.94 y disminuyó a 4.53 a las 96 horas en las inclusiones de melaza de 20 y 25% y de 4.63 y 5.00 en los niveles de 15 y 12% respectivamente. Vásquez *et al.* (2011) elaboró ensilado biológico a nivel de laboratorio con glucosa, a partir de residuos viscerales (estómago e intestinos) de pez espada, raya y tiburón, a 25 °C con 25 g de residuos triturados, 8 ml de glucosa y 2 ml del inóculo de bacterias

lácticas, logrando ensilados con valores de $\text{pH} < 4.5$. Los dos tratamientos cumplen con los reportados por varios autores los resultados de pH como un indicador de calidad.

Los resultados de figura 15 y cuadro 17 de anexo, muestran que el tratamiento T3, donde se adiciono menor cantidad de melaza a la residuos frescos de trucha a comparación con los demás tratamientos, los valores de pH se mantuvo cercanos a 4.6 pero no llegó a 4.5, es probable que haya sido insuficiente la melaza para que el *Aspergillus orizae* pueda generar mayor cantidad de ácido; los cuales difieren con lo reportado por Albrecht y Salas (2013), elaboraron ensilado con residuo crudo de anchoveta: melaza: koji (soja inoculada con Cepas de *Aspergillus. orizae*) en las proporciones 10:1.5:1.0, fue almacenado al ambiente y otro grupo a 40°C por 96 horas, las muestras almacenadas al ambiente presentaron valores de pH cercanos a 4.5 a los 21 días, aumentando lentamente el valor de pH hasta los 90 días; el grupo que fue llevado a 40°C mantuvieron valores de $\text{pH} < 4.5$ desde los 3 a 90 días.

Los resultados obtenidos en la figura 15 y cuadro 17 de anexo, muestra que el pH del tratamiento T4 fue de 5.59 a los 9 días, a diferencia de los otros tratamientos que disminuyeron a menores valores de pH , siendo probable que las bacterias de descomposición hayan proliferado generando aminas y aumentando el pH del ensilado y a los 11 días por presentar inicios de descomposición y olor desagradable fue retirado,

Estos resultados evidencian una relación directa entre el nivel de inclusión de melaza (carbohidrato), la influencia de la temperatura ambiental en el buen desarrollo del ensilado, es decir, días soleados con temperaturas ambientales cercanas a 26°C , se llegó en menor tiempo al $\text{pH} \leq 4.5$, es importante mencionar que el pH es un buen indicador del proceso de ensilado, valores de $\text{pH} \leq 4.5$ disminuye la probabilidad de deterioro de los residuos de trucha y asegura la estabilidad del ensilado en almacenamiento.

Batista (1987) encontró para un ensilado de subproductos de pescado valores de pH de 4.39 que es un indicador del grado de calidad del ensilado. Sin embargo, algunos trabajos reportan ensilados con valores de pH de 4.18 a 4.90 (Cira y col., 2002; Plascencia-Jatomea y col., 2002; Vidotti y col., 2002; León, 2003; González y

col., 2005; Ramírez y col. 2008), obteniendo buena calidad y en este intervalo se encuentra en los pH registrados en este proyecto de investigación.

5.3.1.1 ANVA de valores de pH

Se realizaron los análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples para los datos de pH al inicio, el día 1, 7, 11, 28, 40, 55, 79 y a los 93 días.



Cuadro 12. Resultados de ANVA de los valores de pH de los tratamientos

Tratamiento	TIEMPO (Días)															
	1		7		11		28		40		55		79		93	
	pH	SD	pH	SD	pH	SD	pH	SD	pH	SD	pH	SD	pH	SD	pH	SD
1	5.74 ± 0.18 ^b	0.03 ^c	4.47 ± 0.03 ^d	0.02 ^b	4.40 ± 0.03 ^d	0.02 ^b	4.37 ± 0.02 ^b	0.04 ^b	4.39 ± 0.01 ^b	4.39 ± 0.04 ^b	0.01 ^b	4.47 ± 0.01 ^b	4.48 ± 0.01 ^b	4.48 ± 0.01 ^b	4.48 ± 0.01 ^b	0.01 ^b
2	5.89 ± 0.05 ^b	0.04 ^c	4.55 ± 0.02 ^c	0.02 ^b	4.46 ± 0.02 ^c	0.02 ^b	4.41 ± 0.02 ^b	0.03 ^b	4.38 ± 0.02 ^b	4.41 ± 0.03 ^b	0.02 ^b	4.49 ± 0.03 ^b	4.48 ± 0.02 ^b	4.48 ± 0.02 ^b	4.48 ± 0.02 ^b	0.02 ^b
3	6.21 ± 0.03 ^a	0.07 ^b	4.71 ± 0.01 ^b	0.01 ^a	4.62 ± 0.01 ^b	0.01 ^a	4.63 ± 0.01 ^a	0.04 ^a	4.64 ± 0.05 ^a	4.63 ± 0.04 ^a	0.05 ^a	4.77 ± 0.12 ^a	4.77 ± 0.12 ^a	4.77 ± 0.12 ^a	4.77 ± 0.12 ^a	0.12 ^a
4	6.27 ± 0.07 ^a	0.03 ^a	5.56 ± 0.01 ^a	0.01 ^a	5.54 ± 0.01 ^a	0.01 ^a										
Probabilidad	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

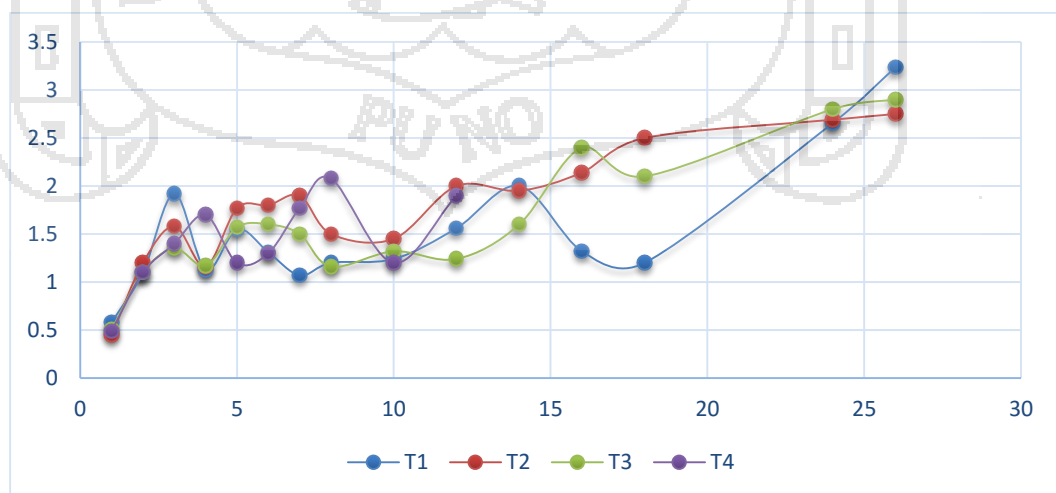
La significancia ($P < 0.0001$) observada en el ANVA (Cuadro 12, desarrollados en los cuadros de 21 al 28 de anexo) nos indica que existe diferencia de por lo menos uno de los tratamientos, esto en confirmado con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$), existe dos grupos (T1, T2 versus T3 y T4), que son diferentes ($p < 0.05$) a los días 1 a los 11, 28, 40, 55, 79 días. A los 93 días se evidenció diferencia significativa entre valores de pH ($p > 0,05$) T1 y T2.

5.3.2. ACIDEZ

Los resultados obtenidos en la Figura 16, muestran los valores de porcentaje de acidez observados fueron fluctuantes durante el estudio, en los tratamientos (T1, T2) fue menor probablemente se deba a la temperatura, a la cantidad de melaza administrada y koji, como se sabe el descenso de pH produce ácido láctico, estos tratamientos presentaron valores de pH muy bajos comparados con T3. El tratamiento T3 muestra mayores valores de % de acidez sin embargo no le corresponden menores valores de pH, los resultados obtenidos; son similares reportado por González y Marín (2006) utilizan bacterias del yogurt para ensilar pescado y reportan un porcentaje de acidez de 3.5 a 4.0 el cual no fue un indicador de calidad de ensilado.

Estudios efectuados sobre el proceso de fermentación láctica han demostrado que la formación de ácido láctico sobre el sustrato, genera un ambiente que inhibe el desarrollo de la mayoría de los microorganismos de putrefacción, debido a que el ácido láctico es un fuerte antagonista de las bacterias putrefactas y patógenas. Este efecto antagonista se ha atribuido a la formación de ácidos orgánicos no disociados producidos por la fermentación durante el proceso (Sorrella y Speck, 1970).

Figura 16. Valores de porcentaje de acidez (ácido láctico) en función al tiempo



5.3.2.1 ANVA de porcentaje de acidez

Se realizaron los análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples para los datos de % de acidez para el día 1, a los 7 días, a los 11 días y 26 días.

Cuadro 13. Resultados de análisis de ANVA de los valores de % de acidez

Tratamiento	1		7		11		26	
	% de acidez	SD	% de acidez	SD	% de acidez	SD	% de acidez	SD
1	0.87±	0.20 ^b	1.06±	0.18 ^b	1.56±	0.15 ^b	3.41±	0.18 ^a
2	0.92±	0.36 ^b	0.73±	0.13 ^b	1.99±	0.22 ^b	2.76±	0.56 ^a
3	2.35±	0.37 ^a	3.05±	0.92 ^a	5.24±	0.09 ^a	3.63±	0.23 ^a
4	1.89±	0.15 ^a	2.78±	0.16 ^a	1.46±	1.27 ^b		
Probabilidad	0.0001		0.0001		0.0001		0.058	

La significancia ($P < 0.0001$) observada en el ANVA (Cuadro 13, desarrollado en los cuadros 29 al 32, anexo) nos indica que existe diferencia de por lo menos uno de los tratamientos, esto en confirmado con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$), existe dos grupos (T1, T2 versus T3 y T4), que son diferentes ($p < 0.05$) a los día 1 a los 7 y a los 11 y a los días 26 no hubo diferencia.

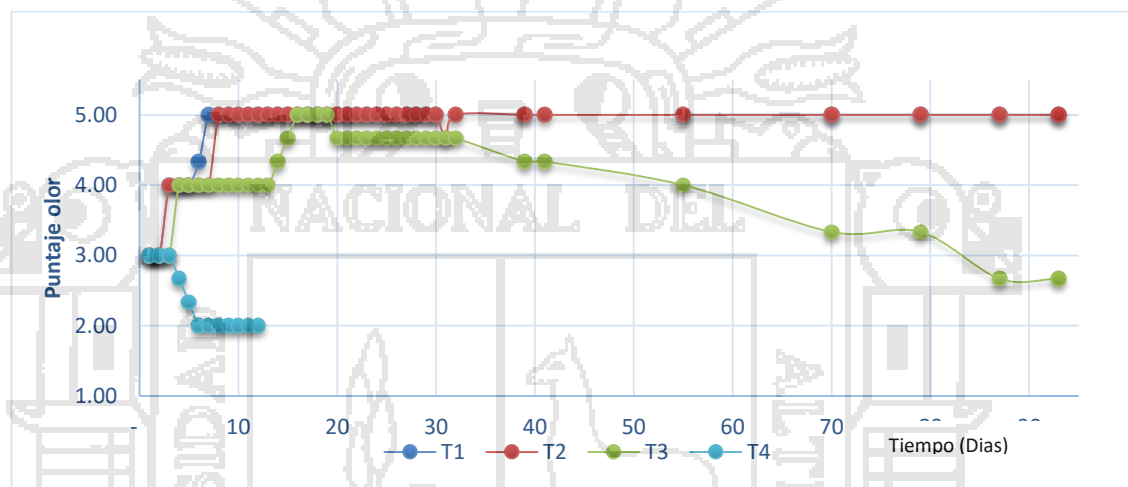
5.3.3 ANÁLISIS SENSORIAL

Resultados y discusión:

Los resultados obtenidos en la figura 17, y en el Cuadro 18 de anexo, muestran que desde el segundo día de la preparación de ensilado se percibió una mezcla de olores de pescado y melaza, posteriormente se incrementó el olor a frutas de los tratamientos T1 y T2, manteniendo la mayor calificación hasta el término del estudio (93 días). El tratamiento T3 disminuyó gradualmente la calificación, debido probablemente a que no se formaron los ácidos orgánicos, y a los 80 días se percibió el olor a descomposición. El ensilado T4 inició su descomposición desde los 4 días, los resultados coincide con los comentarios de Vidotti y col. (2002) que encontró que los ensilados originan productos con

características diferentes. Pérez y col (1997), reportaron que los olores desagradables son muy propensos en las conservaciones de pescados y mariscos al ser alimentos proteicos muy putrescibles, cuando no pueden ser conservados correctamente en refrigeración o cuando no se tienen adecuados preservantes, ya que contienen una flora bacteriana normal, que unida a los contaminantes que se agregan al capturarlos y manipularlos, invaden la piel y la carne con gran rapidez, produciendo sustancias que ocasionan alteraciones del olor.

Figura 17. Calificación en el olor de las muestras de ensilado



Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación en T2 es similar reportado por Bertullo (1989), en Evaluación física de la calidad de ensilado de acuerdo a sus características obtuvo un olor a ácido suave.

5.3.4 HISTAMINA

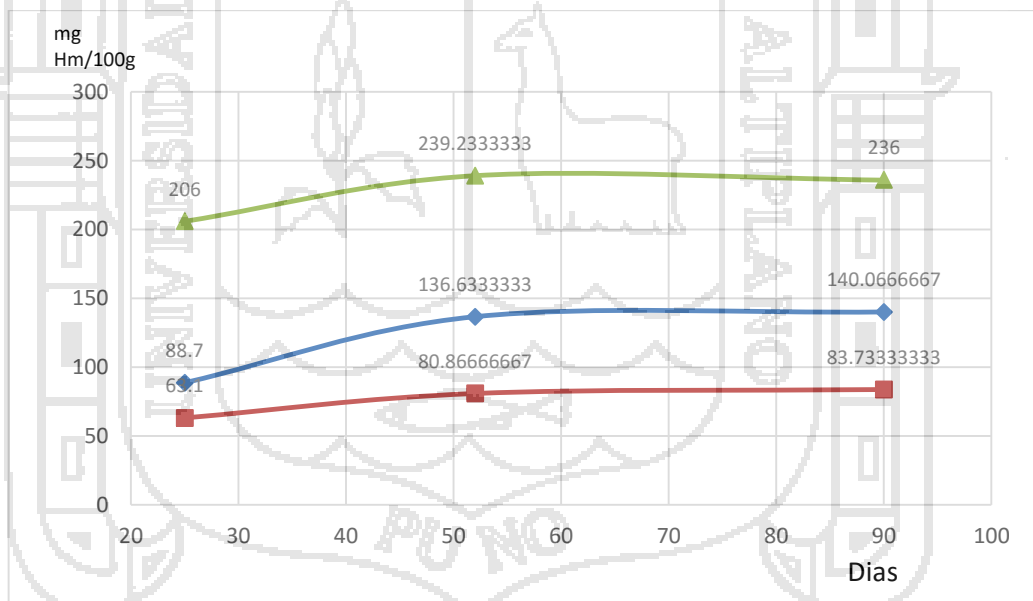
Los valores de histamina se muestran en la Cuadro 14, al realizar el análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples se obtuvieron los siguientes resultados a los 25, 52 y 90 días.

Cuadro 14. Valores promedio y desviación estándar de histamina (mg/kg de ensilado) a los 25, 52 y 90 días de almacenamiento

TRATAMIENTO	DIAS DE ALMACENAMIENTO		
	25	52	90
T1	88.7 ^a ± 4.2	136.6 ^a ± 12.8	140.1 ^{ab} ± 18.2
T2	63.1 ^a ± 2.0	80.8 ^a ± 15.9	83.7 ^a ± 20.4
T3	206 ^b ± 84.9	239.2 ^b ± 75.2	236 ^b ± 82.3

La significancia ($P < 0.005$) observada en el ANVA (Cuadro 14, desarrollado en los cuadros 33 al 34, anexo) nos indica que existe diferencia en los tratamientos, esto en confirmado con la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ($p < 0.05$), existe dos grupos (T1, T2 versus T3), que son diferentes.

Figura 18. Valores de histamina de los tratamientos T1, T2 y T3



Se encontró histamina en los ensilados preparados con residuos crudos de trucha, eso indicaría la presencia del aminoácido histidina. La histamina, es producida a partir de la descarboxilación de la histidina, la mayoría de las bacterias del deterioro, que poseen actividad descarboxilasa, son activas en respuesta al pH ácido, presumiblemente para elevar el pH del medio de

crecimiento a través de la producción de aminas (histamina), (Huss, 1988), reporta que la otra posibilidad de formación de histamina puede ser la descarboxilación de la “histidina proteica” generada durante la hidrólisis proteica en el proceso de ensilado.

En el presente trabajo los valores de histamina de los tratamientos T1 y T2 (140.1 ± 18.2 y 83.7 ± 20.3 mg histamina/kg ensilado) fueron menores que lo permitido para consumo humano (<200 mg histamina/kg de pescado), éstos tratamientos se recomiendan para la elaboración de ensilado destinado para alimento de animales. Los valores de histamina encontrados en este trabajos fueron inferiores a los encontrados por Albrecht y Salas (2013) de 549 mg histamina/kg de ensilado (15 días de almacenado el ensilado al ambiente) y 708 mg histamina/kg (90 día de almacenamiento al ambiente). SANIPES (2010) indica que en los productos de la pesca procedentes de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina considera 200mg/kg como valor límite. Y productos de la pesca sometidos a tratamiento de maduración enzimática en salmuera fabricados a partir de especies de pescados asociados a un alto contenido de histidina considera 400mg/kg como valor límite, para consumo humano. La Comunidad Europea Europea establece un valor máximo promedio de histamina de 100mg/kg; mientras que FDA(Food Drug Administración) establece que los niveles no debe superar los 50mg/kg para pescado y de 200mg/kg para pescado enlatado, para consumo humano. En harina de pescado se establecen niveles promedios máximos de histamina según el tipo de harina: súper prime (250mg/kg), prime (600mg/kg) y estándar (por encima de 600mg/kg) (Fernández, 2002). En Chile en un principio se consideraron 1500 mg/kg como valor límite, para una harina de pescado de buena calidad, luego éste valor se rebajó hasta 1000 mg/kg, sin embargo algunos países plantean un máximo de 300 mg/kg, cifra que se estima baja y difícil de lograr en forma regular en el producto chileno (Zaldívar, 1992).

La figura 18 y Cuadro 14, muestran que el tratamiento T3 presentaron mayores valores de histamina llegando hasta 236 ± 82.3 g histamina/kg ensilado. Los resultados obtenidos en comparación con autores mencionados se encuentran dentro los límites permitidos.

5.3.5 EVALUACIÓN DE DIGESTIBILIDAD DEL ENSILADO

La utilización de diferentes técnicas y materias primas utilizadas en la elaboración de los ensilados biológicos, muestran mucha divergencia en su composición (Padilla *et al.*, 1996). Por esta razón existen controversias entre autores sobre la eficiencia alimenticia; ya que hay quienes aseguran que la digestibilidad del ensilado es cerca del 100 % y la de la harina de pescado fluctúa entre 75 y 80% (Padilla *et al.*, 2000).

Cuadro 15. Prueba de digestibilidad de ensilado biológico

ENSAYO	Dieta: 10% ERT	Dieta 5% ERT
	Crecimiento cerdos	Engorde cerdos
Proteína (g/100 g de muestra original) (factor 6.25).	15.9	16.7
Digestibilidad de la proteína <i>in vitro</i> (g/100 g de muestra original).	89.3	89.2

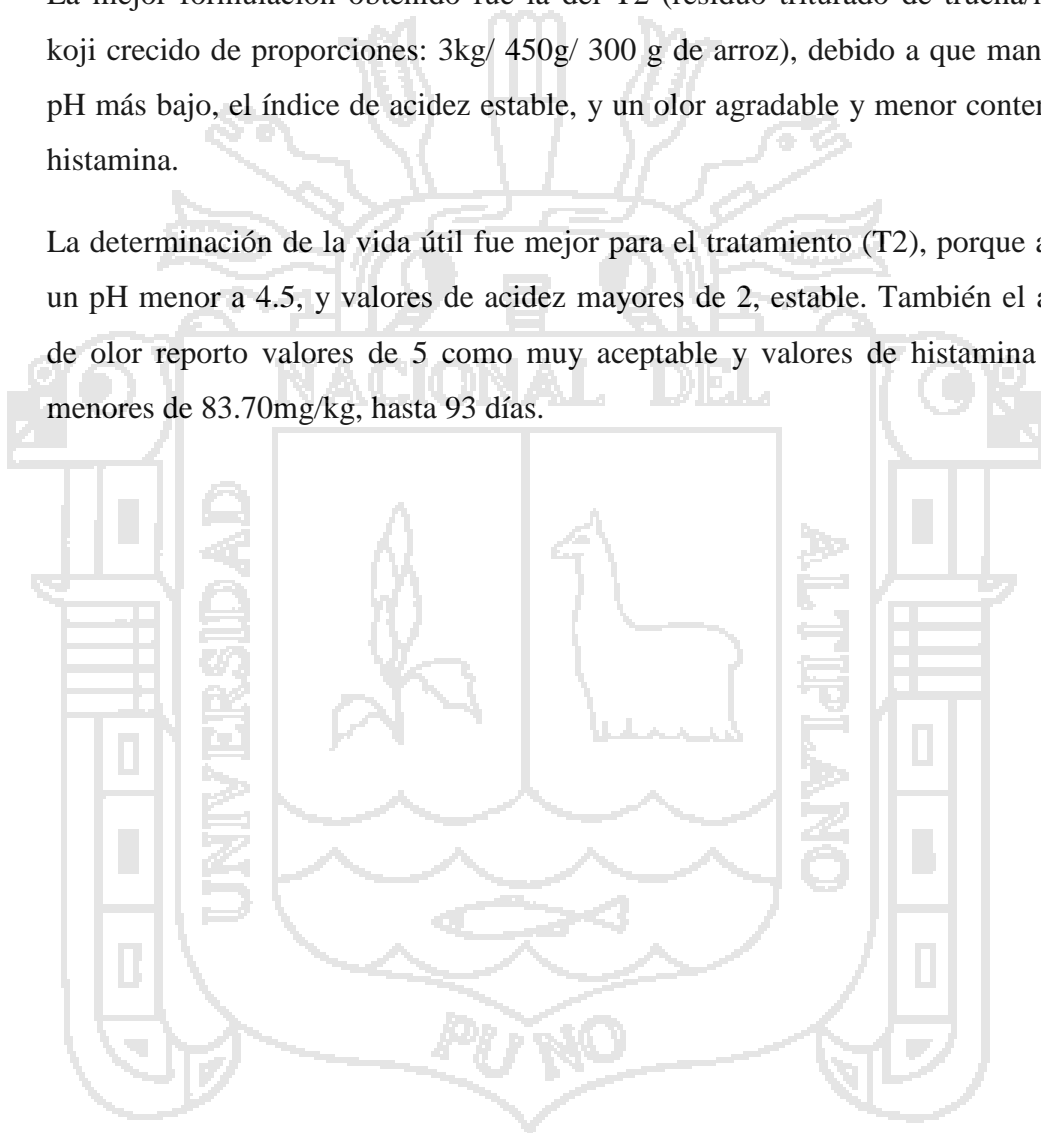
En el cuadro 15 y anexo 4, se muestran la digestibilidad *in vitro* de la proteína determinada en los alimentos con 5 y 10% de ensilado biológico, fueron de 89.3% y 89.2%, superior a lo recomendado por Nørgaard *et al.* (2015) quienes reportaron que la digestibilidad ideal de la proteína del ensilado de pescado en cerdos es 61%. la digestibilidad es un indicador de calidad de ensilado.

CONCLUSIONES

El crecimiento de hongo *Aspergillus orizae* es mejor en cebada 25°C durante 60 horas, en la papa a 26°C por 62 horas y en el arroz a 26°C durante 60 horas.

La mejor formulación obtenido fue la del T2 (residuo triturado de trucha/melaza/ koji crecido de proporciones: 3kg/ 450g/ 300 g de arroz), debido a que mantuvo el pH más bajo, el índice de acidez estable, y un olor agradable y menor contenido de histamina.

La determinación de la vida útil fue mejor para el tratamiento (T2), porque alcanzo un pH menor a 4.5, y valores de acidez mayores de 2, estable. También el análisis de olor reporto valores de 5 como muy aceptable y valores de histamina fueron menores de 83.70mg/kg, hasta 93 días.



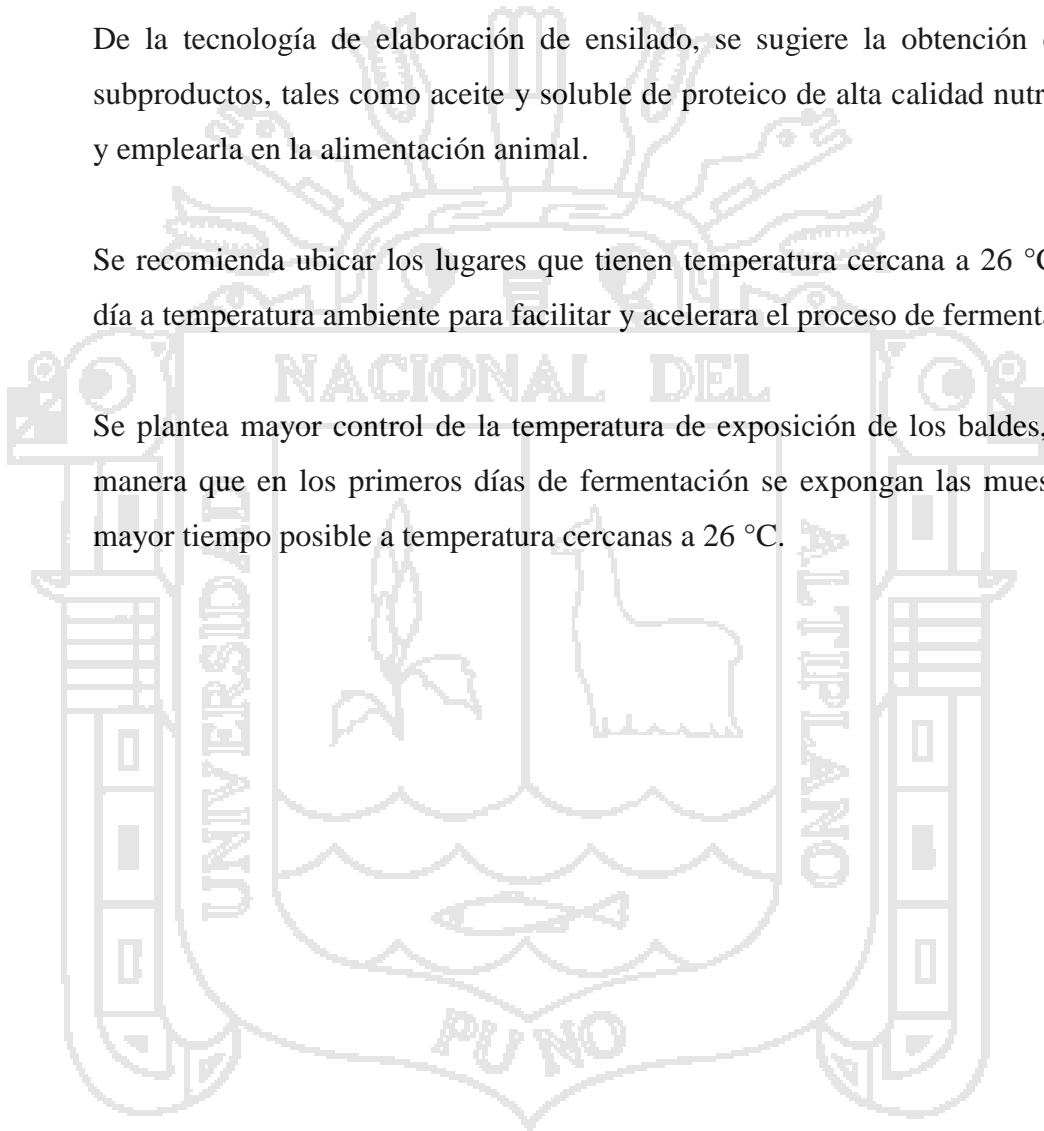
RECOMENDACIONES

Debido a la alta humedad del ensilado biológico de productos pesqueros infrautilizadas, se sugiere diseñar un equipo evaporador, optimizando su eficiencia, para la remoción del agua de tal forma se incrementará el valor nutricional y económico del producto.

De la tecnología de elaboración de ensilado, se sugiere la obtención de dos subproductos, tales como aceite y soluble de proteico de alta calidad nutricional y emplearla en la alimentación animal.

Se recomienda ubicar los lugares que tienen temperatura cercana a 26 °C en el día a temperatura ambiente para facilitar y acelerar el proceso de fermentación.

Se plantea mayor control de la temperatura de exposición de los baldes, de tal manera que en los primeros días de fermentación se expongan las muestras el mayor tiempo posible a temperatura cercanas a 26 °C.



BIBLIOGRAFÍA

- Albrecht M. y A. Salas. 2013. Escalamiento en la preparación de ensilaje crudo de pescado mediante la adición de koji y melaza. Bol. Invest. Inst. tecnol. Prod. Perú. Volumen 11:11-15.
- Albrecht M. & M. Torpoco. 2008. Obtención de residuos crudos de pescado fermentados y proteolisados (ensilados) mediante el uso de “koji”. Bol. Invest. Inst. tecnol. Prod. Perú. Volumen 8:9-16
- AOAC, (1998). Official Methods of, 16 th Edition, Association of Official Analytical Chemistis, AOAC International, Gaithersburg, Maryland. Editado por Patricia Cunnit.
- ARAPA S.A.C., (2015). Composición proximal del ensilado biológico de trucha. Informe 1. Proyecto: *Implementación de una técnica de ensilado biológico en los residuos crudos de trucha como insumo para la elaboración de dietas balanceados de alta digestibilidad y de bajo costo, para la alimentación de ganado en Puno.* pp. 3.
- Areche, N., Z. Berenz, y G. León, (1992). Desarrollo de ensilado de residuo de pescado utilizando bacterias lácticas de yogurt en engorde. *En: Segunda Consulta de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina. 11-15 de diciembre. Informe de Pesca. FAO. Roma. 441: pp. 51-63.*
- Bechman A., Phillips, R. & Chen J. 2012. Changes in select physical property and enzyme activity of rice and barley koji during fermentation and storage. J. Food Sci 2012 Jun, 77 (6):M318-22
- Barroga, A.J., Pradhan, R. y Tobioka, H. (2001). Evaluation of fish silage-sweet potato mixed diet with Italian ryegrass silage as basal ration on nitrogen utilization and energy balance in growing lambs. Journal of Animal Science. 72(3):189-197.

- Balsinde, R, M, F, C, Lleana, y L, J, Galindo, (2003). Inclusión de ensilado de pescado como alternativa en la elaboración de alimento extruido para el camaron de cultivo (*Litopenaeus schimitti*). Centro de Investigaciones Pesqueras, Cuba, Civa. 303-309.
- Bello, R. (1994). Experiencia de ensilado de pescado en Venezuela. En: taller “Tratamiento y utilización de desechos de origen animal u otros desperdicios en la ganadería”. FAO. La Habana, Cuba, del 5 al 8 de setiembre. En línea: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap1.htm>.
- Bello, R. A. (1993). Experiencias con Ensilado de Pescado en Venezuela, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Universidad Central de Venezuela Caracas, Venezuela. Disponible en Internet: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/FRG/APH134/cap1.htm>
- Berenz, Z. (1994). “Utilización de ensilado de residuos de pescado en pollos. En: taller tratamiento y utilización de desechos de origen animal u otros desperdicios en la ganadería”. FAO. La Habana, Cuba, del 5 al 8 de setiembre. En línea: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap2.htm>.
- Bermúdez, J.E., Rodríguez, J.H., Ocampo, A., y Peñuela, L. (1999). Ensilaje de vísceras de pescado Cachama blanca (*Piaractus brachiponum*) como fuente de proteína para la alimentación de cerdos en una dieta con aceite crudo de palma. *Livestock Research for Rural Development*. 11(2).
- Bertullo, V., C. Corencia, C. Álvarez, y H. Figares, (1986). Harina de pescado versus Bio-proteo-catenolizado de pescado en la alimentación de cerdos. Presentado en “Second World Conferense in Animal Production”. Universidad Maryland. EE.UU. pp. 201-217
- Betancourt, L., G. Díaz, X. Aguilar, y J. Ríos. (2010). Efecto del ensilaje de vísceras de trucha (*Oncorhynchus mykiss*) sobre el comportamiento productivo y el contenido de ácidos omega-3 en hígado, muslos y pechuga, de pollos de engorde. *Unidad Toxicología Veterinaria: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de*

Zootecnia, Universidad de La Salle Bogotá, Colombia. Accedido enero 9 de 2012, <http://www.lasalle.edu.co>.

Bermúdez, Julio et al. 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*). Villavicencio (Colombia): Universidad de los Llanos. Disponible en Internet: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd11/2/ocam112.htm>

Bustari, H. (2003). Fermentation of fish silage using *Lactobacillus pentosus*. Jurnal Natur Indonesia.: [http://www.unri.ac.id/jurnal_natur/vol6\(1\)/Bustari.pdf](http://www.unri.ac.id/jurnal_natur/vol6(1)/Bustari.pdf).

Berenz J, A. Navarrete y G, Reyes. (1990). Ensilado biológico de pescado. CURSO REGIONAL SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUCTOS PESQUEROS FAO/PROGRAMA DE COOPERACION GUBERNAMENTAL. Caracas, Venezuela 18 de junio- 13 de julio de 1990.

Berenz, Z., (1994). Utilización del ensilado de residuos de pescado en pollos: capítulo 2. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, Callao. <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/A PH134/cap2.htm>.

Botello, A. L. (2005). Utilización de diferentes ensilados químicos de pescado en la alimentación de alevines de pez gato Africano (*Clarias gariepinus Burchell, 1822*). Tesis presentada en opción al título académico de master en biología marina con mención acuicultura. Centro de Investigaciones marinas. Universidad de la Habana.

Cardona, G. (2000)., Estudios Previos de conocimiento de la cuenca del río Arauca en los sectores de Saravena, Arauquita y Arauca. Dirección Departamental del Medio Ambiente. Arauca.

Cepis. (1997). Proyecto de prevención de la contaminación del puerto de los Ángeles. Evaluación de una fábrica de enlatado y procesamiento de pescado. Disponible en Internet: <http://www.cepis.org.pe/eswww/fulltext/epa/epp/pescap02.html>

- Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. y Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*. 37:1359-1366.
- Cira, L.A. (2000). Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Cisneros, M., P, Vyraphet., y Martínez (2004). Conservación de residuos de pescado utilizando melaza de caña de azúcar. Características organolépticas y bromatológicas. Centro de estudios de producción animal (CEPA). Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad de Granma Cuba.
- Copes, J., K, Pellicer., G, del Hoyo., y N, García. (2006). Producción de ensilado de pescado en baja escala para uso de emprendimientos artesanales. *Analecta Veterinaria*. http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/volumenes/AV_vol26_n1_2006.pdf
- Coello, N., Montiel, E., Concepción, M. y Christen, P. (2002) Optimization of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. *Bioresource Technology*.
- Cordova, E., C, Marmol., L, Miranda., J, A. Navarrete y Reyes. (1990). Ensilado biológico de pescado. CURSO REGIONAL SOBRE TECNOLOGIA DE PRODUCTOS PESQUEROS FAO/PROGRAMA DE COOPERACION GOBERNAMENTAL. Caracas, Venezuela 48 hr. http://www.mag.gob.sv/admin7publicaciones/eupload_file/1127505572_21.pdf
- De la Rosa, B. (2005). El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV Jornadas de alimentación animal. Laboratorio de Mouriscade. Lalin (Pontevedra). 7 de Octubre. http://www.mouriscade.com/doc_ponencia/oct2005/ensilado_zonas_humedas_e_in_dicadores_calidad.pdf.

- Díaz, 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 nutriente de heno de gramíneas y leguminosas tropicales. Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado en ciencias, Universidad de Puerto Rico, Recinto universitario de Mayagüez.
<http://grad.uprm.edu/tesis/diazrios.pdf>
- DIREPRO, (2013). Dirección Regional de la Producción. Desarrollo acuícola y su implicancia en la cuenca del lago Titicaca Puno. Dirección de Acuicultura e Investigación. acuiculturapuno@yahoo.es
- DIREPRO, (2016). Dirección Regional de la Producción. Desarrollo acuícola y su implicancia en la cuenca del lago Titicaca Puno. Dirección de Acuicultura e Investigación. acuiculturapuno@yahoo.es.
- Enes Dapkevicius, M.L.N., Nout, M.J.R., Rombouts, F.M. y Houben, J.H. (2007) Preservation of blue-jack mackerel (*Trachurus picturatus bowdich*) silage by chemical and fermentative acidification. *Journal of Food Processing and Preservation*.
- Espe, M., Haaland, H. y Njaa, L.R. (1992). Substitution of fish silage protein and a free amino acid mixture for fish meal protein in a chicken diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Fagbenro, O., K, Jauncey y G, Taylor.(1993). Nutritive value of diet. Containhg dried lactic acid fermented fish silage and soybean meal for juvenile *Oreochromis niloticus* and *clanas gariepinus*. *Aquat. Living Resour.*, 1994, 7,79,85.
Journal.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/alr/pdf/1994/02/alr94203.pdf
- Fagbenro, O.A. y Jauncey, K. (1998). Physical and nutritional properties of moist fermented fish silage pellets as a protein supplement for tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Animal Feed Science and Technology*.

- Fagbenro, O. y Jauncey, K. (1995). Growth and protein utilization by juvenile catfish (*Claria gariepinus*) fed dry diets containing co-dried lactic-acid-fermented fish silage and protein feedstuffs. *Bioresource Technology*. 51:29-25.
- Fagbenro, O.A. (1996). Preparation, properties and preservation of lactic acid fermented shrimp heads. *Food Research International*. 29(7):595-599.
- FAO. (1990). Tratamiento y utilización de residuos de origen animal, pesquero y alimenticio en la alimentación animal. Memorias de un Taller Regional en la Habana Cuba. FAO. Roma, Italia. Editado por: Vilda Figueroa Pp 225. <http://books.google.com.mx/book?d=ssK1bNa3XsMC&dq=Tratamiento+y+Utilizaci%C3%B3n+de+Residuos+de+Origen+Animal+Pesquero+y+Alimenticio+en+la+Alimentaci%C3%B3n+Animal&printsec=frontcovers&source=bl&ots=y3MmMpOMfo&sig=result&resn>
- FAO. (1986). Food and Nutrition Papers 14/7 Manuals of Food Quality Control.
- FAO, (1992). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, segunda consulta, de Expertos sobre Tecnología de Productos Pesqueros en América Latina.um=1
- FDA.2001. Enumeration of yeast and Mold in Food. Dilution Plating Technique. Bacteriological Analytical Manual on Line. January 2001. 8th Edition, Chapter 18, 1995.
- Figueroa, V. (1996). Producción porcina con cultivos tropicales de nutrientes. Publicado por la fundación CIPAV. Cali- Colombia. Pag. 32-66.
- Ghaly, A. E., V.V. Ramakishnan, M. S. Brooks, and D. Dave, (2013). Fish processing wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. *J Microb Biochem Technol* 5: 107-129. Doi:[10.4172/1948-5948.1000110](https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000110)

- Gonzales, D. y Marín, (2005). Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos de procesamiento de sardinas. Revista Científica, FCV-LUZ/Vol. XV, N° 6, 560-567, 2005.
http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?pid=S079822592005012000011&scrip=sci_arttext
- Gonzales, D. y Marín, (2006). Obtención de ensilados biológicos a partir de los desechos de procesamiento de sardinas. Revista Científica, FCV-LUZ/Vol. XV, N° 6, 560-567, 2005.
http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php?pid=S079822592005012000011&scrip=sci_arttext
- Gonzales, G., A. Rodríguez. (2003). Effect of storage method on fermentation characteristics, aerobic stability and forage intake of tropical grasses ensiled in round bales. Journal of dairy science. 86: 926-933.
<http://jds.fass.org/cgi/reprint/86/3/926>.
- Gonzales, D., J, Cordoba ., F, Indorf y E, Buitrago. (2007). Estudios preliminares en la formulación de dietas para camaron blanco (*Litopenaeus schmitti*) utilizando ensilado de pescado. Rc v. 17 n.2.
<http://redalyc.Uae,ex.mx/crc/inicio/artpdfred.jsp?;cve=95917210&;cvenum=107>
- Guerouali, A., Zahar, M. y Benkerroum, N. (1995). Preparation and utilization of fish silage as feed supplement for ruminants. Annales de Zootechnie. 44 (suppl.1):102.
- Hall, G.M. (2002). Lactic acid bacteria in fish preservation. En: Safety and quality issues in fish processing. (H.A. Bremner, edit.). 1st edition. Pp. 330-347, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. England.
- Hassan, T.E. y J.L. Health. (1986). Biological fermentation of fish waste for potential use in animal and poultry feeds. Agriculture wastes. 15:1-15.
- Herrampf J. & Piedad-Pascual F. 2000. Fish and Other marine silage. Handbook on ingredients for Aquaculture Feeds. pp 198- 210. Editorial Springer.

- Huss, H. (1998). El pescado fresco: su calidad y cambios en su calidad. FAO. Fisheries technical. Rome. Paper N° 384. 202 pp.
<http://www.fao.org/docrep/006/y4743e7y4743e03.htm>.
- Izquierdo P., G. Torres, E. Gonzales, y E. Márquez, (2000). Caracterización Físico – químicas de las carne de trucha (*Oncorhynchus mykiss*). Revista Científica, FCV-LUZ. Vol.: IX, N° 2: pp 21- 28.
- ITP/BID/UDEP. (1999). “Curso nacional de manipulación y procesamiento de pescado fresco” LIMA –PERU. Realizaciones Graficas Especializadas E.I.R.L. LIMA-PERU.
- ITP, (1997). “Procesamiento de ensilado de pescado” XIII Curso Internacional, Tecnología del Producto Pesquero. Realizaciones Graficas Especializadas E.I.R.L. LIMA-PERU.
- James M. (1977) Comparative Study of fish silage Prepared by Microbial Fermentation and formic Acid Silage. Central Institute of fish tech India.
- Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. Applied Environmental Microbiology.
- Jay, J.M. (2000). Modern food microbiology. 6th edition, Aspen publication, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Kikko, (2015). Ficha técnica de Koji. Comunicación e-mail.
- Kjos, N. P. (2001). The use of fish by products in animal feeding. Proceedings of workshop on improved utilization of by products for animal feeding in Vietnam. NUFU project. http://www.vcn.vnn.vn/sp_pape/spec-5-4_2001_14.htm.

- Kjos, N.P., Herstad, O., Overlad, M. y Skrede, A. (2000). Effects of dietary fish silage and fish fat on growth performance and meat quality of broiler chicks. *Canadian Journal of Animal Science*.
- Lassen, T.M. (1994). Evaluation of conditions for fermentation of fish offal. *Agriculture Science in Finland*.
- Lázaro, R., Serrano, M.P. y Capdevila, J. (2005). Nutrición y alimentación de avicultura complementaria: Codornices. En: XXI Curso de especialización FEDNA. Nutrición y alimentación de codornices. (Fundación española para el desarrollo de la nutrición animal, ed.). Pp. 369-408, Madrid, España.
- Li, P., Wang, X., Hardy, R.W. y Gatlin, D.M. (2004). Nutritional value of fisheries by-catch and by-products meals in the diet of red drum. *Aquaculture*. 236:485-496.
- Lonsane, B.K., Saucedo-Castañeda, G., Raimbault, M., Roussos, S., Viniegra
- Llanes, I, J., P, J. Toledo., y V, J. Lazo de la Vega. (2007). Máximo porcentaje de ensilado químico de pescado en la dieta de *clarias gariepinus*. REDVET. Revista electrónica de veterinaria. Vol. VIII, N° 9. <http://www.veterinaria.org/revistas/red/n090907/090728.pdf>
- León L. F. J. (2003). Consumo voluntario y digestibilidad de nutrientes de heno de gramíneas tropicales nativas y ensilaje de sorgo y el efecto de la suplementación con residuos fermentados de pescadería. MS Tesis, Universidad de Puerto Rico, RUM. 63pp. <http://grad.uprm.edu/tesis/leonalamo.pdf>
- Mahmoud, M.I., Malone, W.T. y Cordle, C.T. (1992). Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *Journal of Food Science*.
- Martin, A.M. (1996). Role of lactic acid fermentation in bioconversion of wastes. En: *Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and application*. (T.F. Bozoglu y B. Ray, eds.), Pp. 219.252, Springer-Verlag, Germany.

- Martínez, V.R., M. de la Cruz-Pascual y R.A. Bello, (1991). Elaboración de ensilados biológicos de pescado en Venezuela y España. pp. 43 - 49.
- Miranda, M, O., L, M. Cisneros, y F, M. Otero. (1999). Conservación in vitro de ensilaje de pescado (*Ophistonema oglinum*) con ácido sulfúrico comercial., temperatura, pH y composición química. Instituto de Investigaciones Jorge Dimitrov, Universidad de Gramma, Bayamo, Cuba.
- [http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:BxxtpA6T1d4J:www.reduc.edu.cu/147/05/1/14705101.pdf+Conservaci%C3%B3n+in+vitro+de+ensilaje+de+pescado+\(Ophistonema+oglinum\)+con+acido+sulf%C3%BArico+comercial,+temperatura,+pH+y+composici%C3%B3n+qu%C3%ADmica.&hl=es&gl=mx](http://docs.google.com/gview?a=v&q=cache:BxxtpA6T1d4J:www.reduc.edu.cu/147/05/1/14705101.pdf+Conservaci%C3%B3n+in+vitro+de+ensilaje+de+pescado+(Ophistonema+oglinum)+con+acido+sulf%C3%BArico+comercial,+temperatura,+pH+y+composici%C3%B3n+qu%C3%ADmica.&hl=es&gl=mx)
- Miranda E., (2000). Evaluación de sulfato de cobre como promotor de crecimiento de cerdos de engorde. Proyecto Especial del Programa de Ingeniería Agronómica. Honduras. pp. 12.
- Miranda, O., M. Otero y M. Cisneros, (2001). Ensilaje de pescado a partir de la captura del camarón. Características físico-químicas, Rev. Prod. Anim. pp. 9-11.
- Miranda, M, O., L, M. Cisneros, y F, M. Otero. (2004): ensilaje de pescado del subproducto *Oreochromis aureus* conservado con ácido sulfúrico comercial. evaluación del pH, composición química. Revista electrónica de veterinaria. <http://comunidad.veterinaria.org/articulos/articulo.cfm?articulo=08008&pag=1&area=1&buscar=&donde=1>
- Mitchel, D.A. y Lonsane, B.K. (1992). Definition, characteristics and potencial. En: Solid substrate cultivation. (H.W. Doelle, D.A. Mitchell y C.E Rolz, eds.). Pp. 1-13. Elsevier Science publishers, England.
- Morales, F. (2008). Preservación mediante el proceso de hidrolizado de la fauna a del pescado. Como alimento proteico para el ganado. Tesis de médico veterinario

zootecnista, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz, Universidad Veracruzana, Ver 32pp.

Norma Chilena 2637. Of. 2001. Productos hidrobiológicos- Determinación de histamina y otras aminas biogénicas. Método HPLC con detector UV.

Plascencia, M., A. Olvera, A. Arredondo, and K. Shirai, (2002). Feasibility of fishmeal replacement by shrimp head silage protein hydrolysates in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:753-759.

Parin, M. y A, Zugarraurdi. (1994). En Taller “Tratamiento y utilización de desechos de origen animal y otros desperdicios en la ganadería”. FAO. La Habana, Cuba, del 5 al 8 de septiembre. Disponible en línea: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/APH134/cap4.htm> 1994.

Padilla P.; Alcantara F. y Garcia j. (2000). Sustitucion de harina de pescado por ensilado biológico de pescado en raciones para juveniles de gamitana, *Colossoma macropomun*. *Folia amazónica* Vol. 10(1-2) P. 225-240.

Padilla Perez P. (1996) IIAP 147 NOTA CIENTIFICA TECNICA DEL ENSILADO BIOLOGICO DE RESIDUOS DE PESCADO PARA RACION ANIMAL.

Pérez, R. (1995). *Piscicultura*. Editorial el Manual Moderno S.A. México.

Ponce, L.E. and A.G. Gernat, (2002). The effect of using different levels of tilapia by-product meal in broiler diets. *Poult. Sci.*,81: 1045-1049.

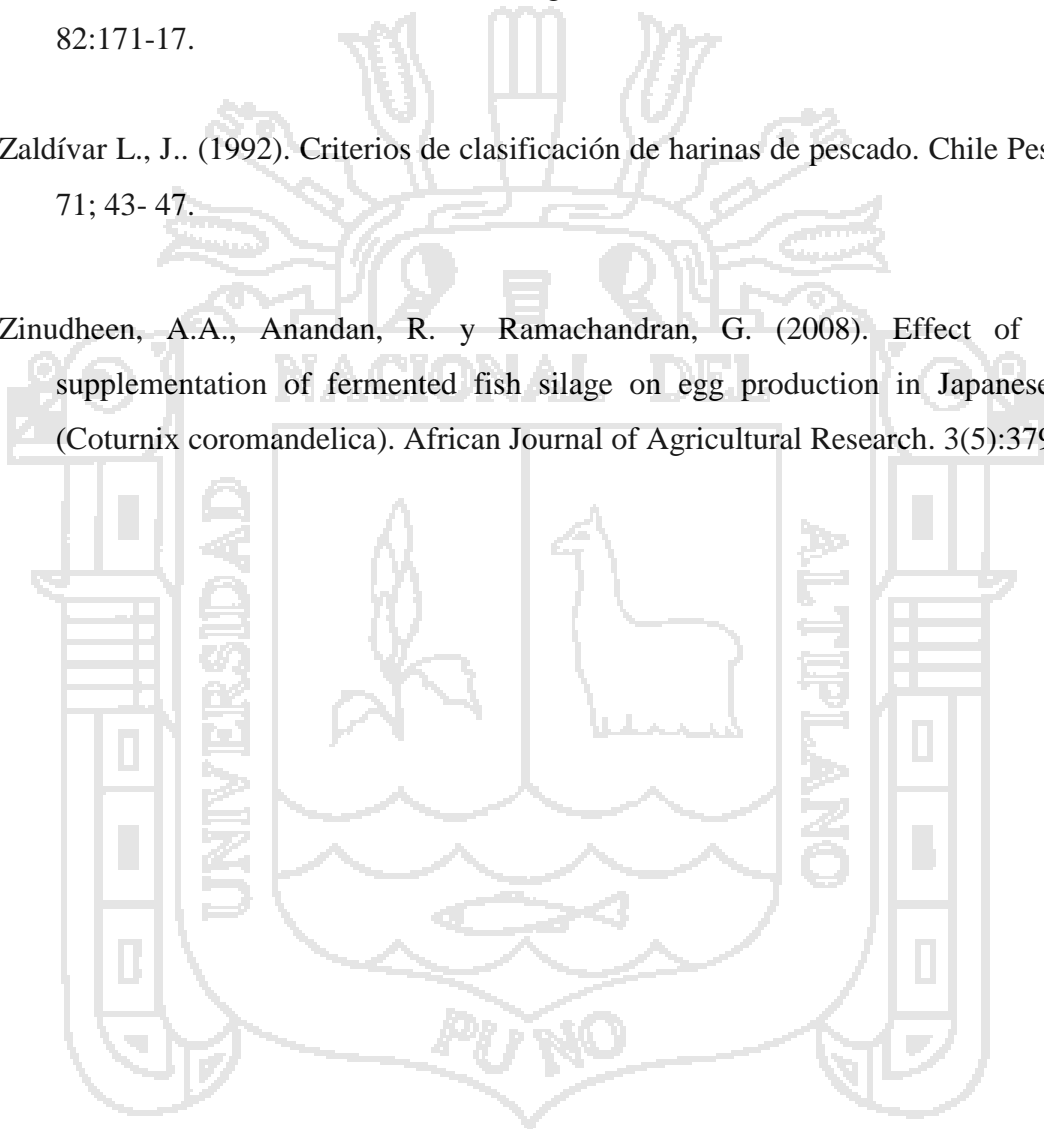
Raa, J. and A. Gildberg, (1982). Fish silage a rewiw, *CRC Criticall Reviews in food science and nutrition*. April. pp. 383 – 417.

- Reyes, R. (2009). Alimentación de borregas en lactación y empadre con ensilado biológico de pescado en la dieta. Tesis profesional. Facultad de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad veracruzana, Veracruz.
- Rodríguez, A. y H, Díaz. (2005). Fermentación anaeróbica de residuos de pescadería y su utilización en dietas para pequeños rumiantes. Integrando producción animal y media ambiente. Vol. 1; 4_6.
- Rojas, D., (2000), Sistemas de Evaluación de la Calidad Ambiental de Corrientes de Agua Superficial. Con base en la interpretación de parámetros físico químicos. Universidad de la Salle. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Bogotá.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. y Gorbach S.L., (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. En: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. En: (S. Salminen, y A. von Wright, eds.), 2nd edition. Pp. 211-254, Marcel Dekker Inc. New York, USA
- Samuel, W.A., J. P. Fontenot, V. G. Allen y M. D. A. Adazinde. (1991). Seafooded processing wastes ensiled with Straw. Utilization and intake by sheep. J.anim. scin 69:4983_4992. <http://jas.fass.org/cgi/content/abstract/69/1274983>.
- SIICEX. 2014. Informe anual 2014. Desarrollo del comercio exterior pesquero en el Perú 2014. Departamento de Productos Pesqueros de la Sub Dirección de Promoción Internacional de la Oferta Exportable, PROMPERÚ.
- Sorrella, K. y M. L. Speck (1970). Inhibition of Salmonella galinarum by culture filtrat of Leuconostoc citrovrum. J. Dairy Sci. 53: 239-241 pp.
- Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P., (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. Ciencia. 47:125-137.

- Shirai, K., (1999). Utilización de desechos de camarón para recuperación de quitina, proteína y pigmentos por vía microbiana. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., González, R.O. y Hall, G.M. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microbial Technology*. 28: 446-452.
- Spanopoulos, Ponce, Barba, Ruelas, Tiznado, Hernández y Shirai (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* .Vol. 9, No. 2 (2010) 167-178.
- Szakács, G., Radvánszky, B. y Gyenes, J. (1988). Large-scale production of animal feed from meat industry by-products by lactic acid fermentation. En: *Biotechnology and Food Industry, Proc Int Symposium*. Pp. 609-615, Budafest.
- Tanikawa, E.. (1985). Fish scrap (cake) an fish meal. In: *Marine products in Japan. Revised Edition*. Koseisha Koseikaku Co., Ltd., Tokyo. 505 pp.
- Torres, M.R. (2002). *Flora intestinal, probióticos y salud*. Segunda edición, Formas finas (edit). Guadalajara, Jal.
- Tatterson, I y M, Windsor. (1974). Fish silage. *J. Sci. Food. Agrie*. 25: 369-379. <http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5937e00.htm>.
- Toledo, P, J. y I, J. Llanes., (2006). Estudio comparativo de los residuos de pescado ensilado por via bioquímica y biológica. *Revista Aquatic*, N° 25, pp. 28-33. http://www.revistaaquatic.com/aquatic/pdf/25_05.pdf

- Van Wyk, H.J. y Heydenrych, C.M.S. (1985). The production of naturally fermented fish silage using various lactobacilli and different carbohydrate sources. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 36:1093-1103.
- Vásquez J., Nogueira, M., Duran, A. Prieto, M. Rodríguez-Amado, I., Rial, D., Gonzales, M. & Murado M. 2011. Preparation of marine silage of swordfish, ray and shark visceral waste by lactic acid bacteria. *Journal of Food engineering* 103 (2011) 442-448.
- Vidotti, R.M., Carneiro, D.J. y Viegas, E.M. (2002). Acid and fermented silage characterization and determination of apparent digestibility coefficient of crude protein for *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 33(1):57-62.
- Vidotti, R.M., Macedo, E.M. y Carneiro, D.J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*. 105:199-204.
- Vizcarra, L.A., Avila, E. y Sotelo, A. (1999). Silage preparation from tuna fish wastes and its nutritional evaluation in broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 79:1915-1922.
- Winter, K.A. and L.A.W. Feltham, (1983). Fish silage: the protein solution. *Agriculture Canada Report*.
- Yeannes, M. I. (1995). Intoxicación por histamina. En: *toxicología de los alimentos*. Ed. Silvestre, A. A. Editorial hemisferio Sur S.A., Buenos Aires, Argentina. 138-152 p.
- Yeannes, M. I. y Casales, M. R. (1995). Influencia del proceso en el nivel de histamina productos pesqueros. *Alimentaria: Revista de tecnología e higiene de los alimentos*. 262: 93-98. Madrid, España.

- Yin, L.J., Tong, Y.L., Jiang, S.T. (2005). Improvement of the functionality of minced mackerel by hydrolysis and subsequent lactic acid bacterial fermentation. *Journal of Food Science*. 70:172-178.
- Zahar, M., Benkerrow, N., Guerouali, A., Laraki, Y. y Yaboudi, K.E. (2002). Effect of temperature, anaerobiosis, stirring and salt addition on natural fermentation silage of sardine and sardine wastes in sugarcane molasses. *Bioresource Technology*. 82:171-17.
- Zaldívar L., J.. (1992). Criterios de clasificación de harinas de pescado. *Chile Pesquero*. 71; 43- 47.
- Zinudheen, A.A., Anandan, R. y Ramachandran, G. (2008). Effect of dietary supplementation of fermented fish silage on egg production in Japanese quail (*Coturnix coromandelica*). *African Journal of Agricultural Research*. 3(5):379-383



ANEXOS

ANEXO 1: ANÁLISIS PROXIMAL, PH, MICROBIOLÓGICO DE RESIDUOS DE TRUCHA

Las caracterizaciones de los residuos de trucha se muestran en Cuadro 11, los residuos de trucha de la primera columna comprenden la cabeza, aletas, vísceras y recortes, la segunda columna se refiere a la trucha que se encuentra frecuentemente en las jaulas por mortandad causada probablemente por el Flavobacterium. Se observa que los residuos de trucha tienen un contenido de proteína de 12,6 % y de grasa 17,9%, en el caso de la trucha muerta por flavobacteriosis presentó 15% de proteína y un menor contenido graso de 6,2%.

Cuadro 16. Composición Química Proximal de los residuos de trucha y de Trucha muerta por flavobacteriosis

COMPONENTES	PROMEDIO (%)	
	Residuos de Trucha	Trucha entera muerta posiblemente por Flavobacteriosis
Humedad (%)	67,20	76,90
Proteína Cruda (%)	12,60	15,00
Grasa Cruda (%)	17,90	6,20
Cenizas (%)	2,40	2,80



Cuadro 17. Lecturas de pH

FECHA	Tratamiento 1				Tratamiento 2				Tratamiento 3				Tratamiento 4							
	1.1	1.2	1.3	DesEs	Prom	DesEs	2.1	2.2	2.3	Prom	DesEs	3.1	3.2	3.3	Prom	DesEs	4.1	4.2	4.3	Prom
PH residuo triturado	6.333	6.333	6.313	6.326	0.01	6.339	6.310	6.341	6.33	0.02	6.221	6.302	6.307	6.277	0.05	6.361	6.344	6.360	6.355	0.01
18/04/2015											6.181	6.252	6.205	6.213	0.04	6.185	6.302	6.322	6.2697	0.07
19/04/2015											5.921	5.572	5.981	5.825	0.22	5.971	5.992	6.300	6.0877	0.18
20/04/2015	5.540	5.848	5.839	5.742	0.18	5.886	5.915	5.826	5.8757	0.05	5.269	5.185	5.446	5.3	0.13	5.884	5.851	5.884	5.873	0.02
21/04/2015	5.365	5.214	5.077	5.219	0.14	5.605	5.487	5.567	5.553	0.06	4.990	4.940	5.154	5.028	0.11	5.609	5.600	5.724	5.6443	0.07
22/04/2015	5.085	4.864	4.709	4.886	0.19	4.867	5.265	5.151	5.0943	0.20	4.939	4.918	5.019	4.959	0.05	5.576	5.363	5.681	5.54	0.16
23/04/2015	4.824	4.696	4.726	4.749	0.07	4.802	4.908	4.983	4.8977	0.09	4.870	5.072	4.890	4.944	0.11	5.676	5.711	5.675	5.6873	0.02
24/04/2015	4.676	4.658	4.675	4.67	0.01	4.965		4.817	4.891	0.10	4.817	4.785	4.871	4.824	0.04	5.668	5.665	5.630	5.6543	0.02
25/04/2015	4.604	4.569	4.675	4.616	0.05	4.742	4.665	4.705	4.704	0.04	4.632	4.770	4.714	4.705	0.07	5.581	5.570	5.518	5.5563	0.03
26/04/2015	4.523	4.537	4.560	4.473	0.02	4.620	4.681	4.678	4.6597	0.03	4.647	4.678	4.697	4.674	0.03	5.578	5.563	5.540	5.5603	0.02
27/04/2015	4.475	4.499	4.444	4.473	0.03	4.586	4.508	4.550	4.548	0.04	4.631	4.665	4.680	4.659	0.03	5.558	5.554	5.548	5.5533	0.01
28/04/2015	4.416	4.449	4.390	4.418	0.03	4.512	4.397	4.468	4.459	0.06	4.568	4.611	4.620	4.6	0.03	5.542	5.544	5.534	5.54	0.01
29/04/2015	4.389	4.434	4.365	4.396	0.04	4.489	4.417	4.443	4.4497	0.04	4.607	4.617	4.622	4.615	0.01	5.537	5.536	5.528	5.5337	0.00
30/04/2015	4.385	4.434	4.364	4.394	0.04	4.490	4.425	4.453	4.456	0.03	4.592	4.517	4.589	4.566	0.04					
1/05/2015	4.383	4.437	4.361	4.394	0.04	4.491	4.445	4.456	4.464	0.02	4.595	4.546	4.618	4.586	0.04					
2/05/2015	4.375	4.387	4.342	4.368	0.02	4.456	4.384	4.420	4.42	0.04	4.545	4.552	4.622	4.573	0.04					
3/05/2015	4.360	4.375	4.339	4.358	0.02	4.489	4.390	4.418	4.4323	0.05	4.532	4.569	4.630	4.577	0.05					
4/05/2015	4.365	4.331	4.318	4.338	0.02	4.505	4.424	4.432	4.4537	0.04	4.560	4.557	4.639	4.585	0.05					
5/05/2015	4.353	4.339	4.328	4.34	0.01	4.450	4.482	4.420	4.4507	0.03	4.562	4.542	4.637	4.58	0.05					
6/05/2015	4.348	4.389	4.351	4.363	0.02	4.440	4.364	4.411	4.405	0.04	4.566	4.553	4.631	4.583	0.04					

7/05/2015	4.317	4.388	4.348	4.351	0.04	4.440	4.366	4.410	4.4053	0.04	4.570	4.568	4.635	4.591	0.04
8/05/2015	4.303	4.346	4.312	4.32	0.02	4.451	4.364	4.405	4.4067	0.04	4.561	4.553	4.636	4.583	0.05
9/05/2015	4.350	4.346	4.379	4.358	0.02	4.440	4.364	4.420	4.408	0.04	4.580	4.598	4.639	4.606	0.03
10/05/2015	4.350	4.348	4.379	4.359	0.02	4.441	4.384	4.423	4.432	0.01	4.590	4.598	4.658	4.615	0.04
11/05/2015	4.352	4.361	4.380	4.364	0.01	4.446	4.384	4.425	4.4183	0.03	4.591	4.599	4.665	4.618	0.04
12/05/2015	4.352	4.361	4.380	4.364	0.01	4.433	4.380	4.420	4.411	0.03	4.590	4.599	4.638	4.609	0.03
13/05/2015	4.352	4.362	4.381	4.365	0.01	4.429	4.373	4.411	4.4043	0.03	4.587	4.599	4.621	4.602	0.02
14/05/2015	4.360	4.500	4.370	4.41	0.08	4.400	4.360	4.400	4.3867	0.02	4.570	4.600	4.670	4.613	0.05
16/05/2015	4.410	4.400	4.330	4.38	0.04	4.520	4.430	4.420	4.4567	0.06	4.630	4.630	4.640	4.635	0.01
17/05/2015	4.343	4.387	4.380	4.37	0.02	4.456	4.386	4.412	4.418	0.04	4.549	4.550	4.567	4.555	0.01
18/05/2015	4.356	4.386	4.380	4.374	0.02	4.432	4.386	4.415	4.411	0.02	4.549	4.567	4.589	4.568	0.02
19/05/2015	4.359	4.387	4.378	4.375	0.01	4.429	4.379	4.411	4.4063	0.03	4.560	4.567	4.590	4.572	0.02
20/05/2015	4.361	4.387	4.373	4.374	0.01	4.421	4.367	4.407	4.3983	0.03	4.565	4.568	4.598	4.577	0.02
29/05/2015	4.407	4.413	4.340	4.387	0.04	4.422	4.373	4.419	4.4047	0.03	4.622	4.589	4.669	4.627	0.04

Cuadro 18. Valores de olor

Días	OLOR											
	Tratamiento 1			Tratamiento 2			Tratamiento 3			Tratamiento 4		
	1.1	1.2	1.3	2.1	2.2	2.3	3.1	3.2	3.3	4.1	4.2	4.3
1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3	4	4	4	4	4	4	3	3	3	3	3	3
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	3
5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2	2	3
6	4	5	4	4	4	4	4	4	4	2	2	2
7	5	5	5	4	4	4	4	4	4	2	2	2
8	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2
9	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2
10	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2
11	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2
12	5	5	5	5	5	5	4	4	4	2	2	2
13	5	5	5	5	5	5	4	4	4			
14	5	5	5	5	5	5	4	4	5			
15	5	5	5	5	5	5	4	5	5			
16	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
17	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
18	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
19	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
20	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
21	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
22	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
23	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
24	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
25	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
26	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
27	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
28	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
29	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
30	5	5	5	5	5	5	5	5	5			
31							5	5	5			
32							5	5	5			
39	5	5	5	5	5	5						
41							5	5	5			

Cuadro 19. Composición proximal de ensilado bilógico de trucha

ENSAYO	RESULTADOS			
	T1	T2	T3	T4
Determinación de Ceniza	1,60%	2,50%	1,80%	1,50%
Determinación de Grasa cruda	30,80%	38,00%	24,80%	24,90%
Determinación de humedad	57,70%	49,40%	60,60%	56,30%
Determinación de proteína cruda	7,30%	8,10%	7,60%	8,30%

Cuadro 20. Composición proximal de dos muestras de ensilado bilógico de trucha.

Componente	Muestra 1			Muestra 2		
	Húmedo	90 %	100%	Húmedo	90 %	100%
		MS	MS		MS	MS
Humedad, %	59.6	10.0	0	63.0	10.0	0.0
Materia seca, %	40.4	90.0	100	37.0	90.0	100.0
Proteína cruda,%	12.4	27.7	30.8	11.5	28.0	31.1
Grasa cruda (extracto etéreo), %	25.7	57.2	63.6	17.3	42.1	46.8
Ceniza (minerales totales), %	2.4	5.3	5.9	8.2	19.9	22.2

ANEXO 2: ANALISIS ESTADÍSTICOS VALORES DE PH

Se realizaron los análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples para los datos de pH al inicio, a los 7 días, a los 11 días, 28 días y 40 días, 55 días y a los 93 días.

✓ Inicio día 1

Cuadro 21. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación día 01

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	3	2,24987	0,74966	364,32	0.000
Error	8	0,01647	0,00206		
Total	11	2,26634			

S = 0.09946 R-cuad. = 88.21% R-cuad.(ajustado) = 83.78%

T	N	Media	Agrupación
4	3	6.26967	A
3	3	6.21267	A
2	3	5.87567	B
1	3	5.74233	B

✓ **A los 7 días**

Cuadro 22. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 7 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	3	2,24987	0,74966	364,32	0.000
Error	8	0,01647	0,00206		
Total	11	2,26634			

S = 0.04537 R-cuad. = 99.27% R-cuad.(ajustado) = 99.00%

T N Media Agrupación

4 3 5.5563 A

3 3 4.7053 B

2 3 4.5480 C

1 3 4.4727 C

✓ **11 días**

Cuadro 23. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 11 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	3	2.523081	0,841027	1536.82	0.000
Error	8	0.004378	0,000547		
Total	11	2.527459			

S = 0.02339 R-cuad. = 99.83% R-cuad.(ajustado) = 99.76%

T N Media Agrupación

4 3 5.5337 A

3 3 4.6153 B

2 3 4.4640 C

1 3 4.3937 D

✓ **A los 28 días**

Cuadro 24. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 28 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	0.090263	0.045131	137.93	0.000
Error	5	0.001636	0.000327		
Total	7	0.091899			

S = 0.01809 R-cuad. = 98.22% R-cuad. (Ajustado) = 97.51%

T N Media Agrupación

3 2 4.63500 A

2 3 4.41100 B

1 3 4.37400 B

Las medias que no compartan una letra son significativamente diferentes.

✓ **40 días**

Cuadro 25. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 40 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	0.10721	0.05360	40.07	0.000
Error	6	0.00803	0.00134		
Total	8	0.11523			

S = 0.03657 R-cuad. = 93.04% R-cuad.(ajustado) = 90.71%

T N Media Agrupación

3 3 4.62667 A

2 3 4.40467 B

1 3 4.38667 B

✓ **55 días**

Cuadro 26. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 55 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	0.13268	0.06634	65.10	0.000
Error	6	0.00611	0.00102		
Total	8	0.13880			

S = 0.03192 R-cuad. = 95.59% R-cuad.(ajustado) = 94.13%

T N Media Agrupación

3 3 4.64800 A

1 3 4.39700 B

2 3 4.38433 B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

✓ **79 Días**

Cuadro 27. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 79 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	0.16944	0.08472	16.96	0.003
Error	6	0.02997	0.00500		
Total	8	0.19942			

S = 0.07068 R-cuad. = 84.97% R-cuad.(ajustado) = 79.96%

T N Media Agrupación

3 3 4.76867 A

2 3 4.48867 B

1 3 4.46767 B

✓ **93 Días**

Cuadro 28. Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 93 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	0.17205	0.08603	18.33	0.003
Error	6	0.02816	0.00469		
Total	8	0.20022			

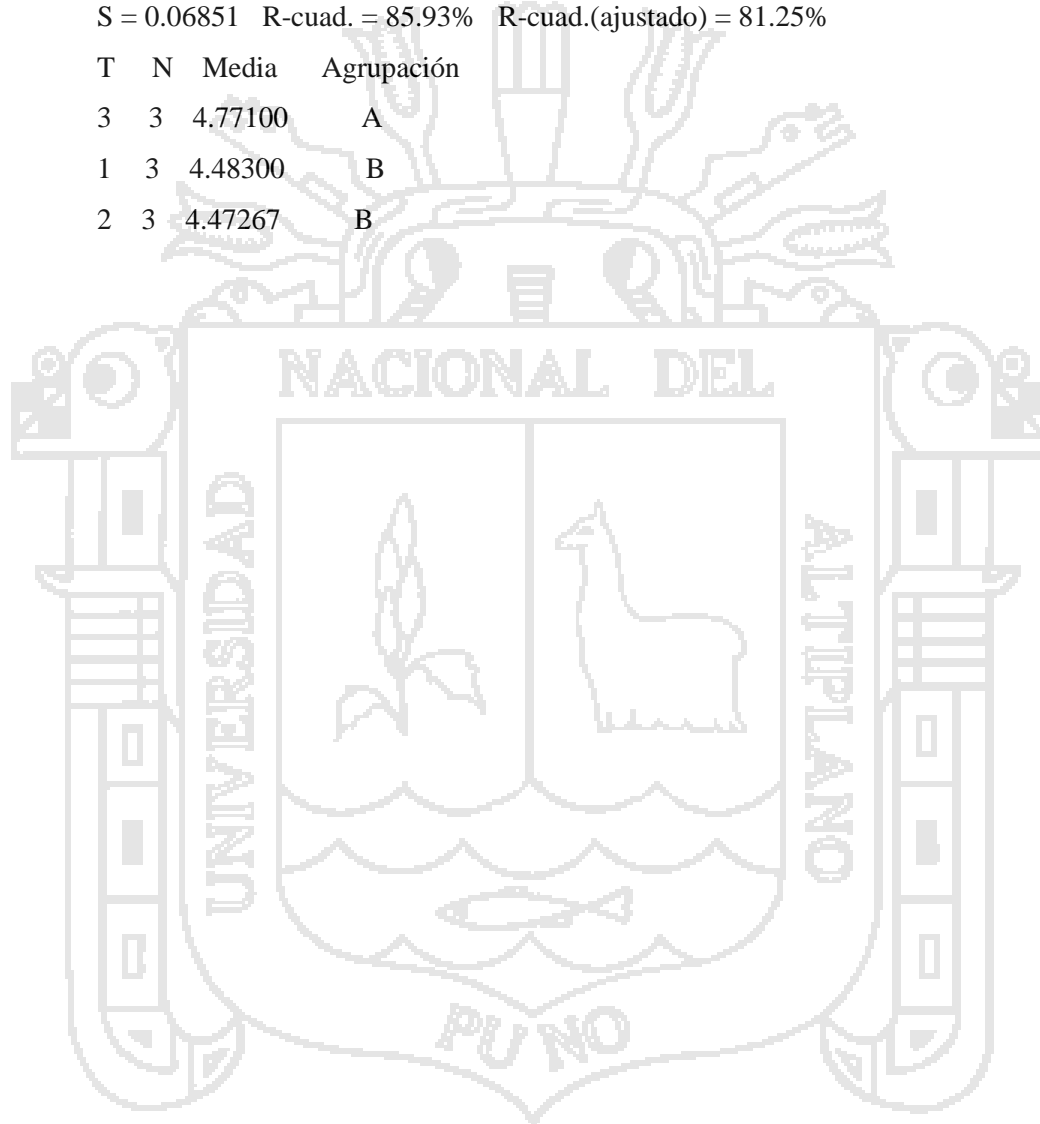
S = 0.06851 R-cuad. = 85.93% R-cuad.(ajustado) = 81.25%

T N Media Agrupación

3 3 4.77100 A

1 3 4.48300 B

2 3 4.47267 B



ANEXO 3: ANALISIS ESTADÍSTICOS DE PORCENTAJE DE ACIDEZ

Se realizaron los análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples para los datos de % de acidez para el día 1, a los 7 días, a los 11 días y 26 días.

✓ **Día 1****Cuadro 29.** Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 1 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T_1	3	4.8200	1.6067	18.85	0.001
Error	8	0.6819	0.0852		
Total	11	5.5019			

S = 0.2920 R-cuad. = 87.61% R-cuad.(ajustado) = 82.96%

T_1 N Media Agrupación

3	3	2.3454	A
2	3	1.8918	A
4	3	0.9169	B
1	3	0.8687	B

✓ **A los 7 días****Cuadro 30.** Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 7 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T_1	3	12.450	4.150	18.40	0.001
Error	8	1.804	0.226		
Total	11	14.254			

S = 0.4749 R-cuad. = 87.34% R-cuad.(ajustado) = 82.60%

T_1 N Media Agrupación

3	3	3.0495	A
4	3	2.7750	A
1	3	1.0672	B
2	3	0.7297	B

✓ **11 días****Cuadro 31.** Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 11 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T_1	3	29.085	9.695	23.05	0,000
Error	8	3.363	0.420		
Total	11	32.448			

S = 0.6484 R-cuad. = 89.64% R-cuad.(ajustado) = 85.75%

Agrupar información utilizando el método de Tukey

T_1 N Media Agrupación

3 3 5.2410 A

2 3 1.9980 B

1 3 1.5636 B

4 3 1.4652 B

✓ **A los 26 días****Cuadro 32.** Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 26 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T_1	2	1.259	0.629	4.74	0,058
Error	6	0.797	0.133		
Total	8	2.055			

No existió diferencia significativa entre los valores de % de acidez de los tratamientos T1, T2 y T3 a los 26 días.

ANEXO 4: ANALISIS ESTADISTICOS DE VALORES DE HISTAMINA✓ **55 días****Cuadro 33.** Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 55 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	38717	19358	9.57	0.014
Error	6	12131	2022		
Total	8	50848			

S = 44.97 R-cuad. = 76.14% R-cuad.(ajustado) = 68.19%

T N Media Agrupación

3	3	239.23	A
1	3	136.63	A B
2	3	80.87	B

✓ **93 días****Cuadro 34.** Análisis de varianza de comportamiento de pH durante la fermentación a los 93 días

Fuente	GL	SC	CM	F	P
T	2	35562	17781	7.08	0.026
Error	6	15074	2512		
Total	8	50636			

S = 50.12 R-cuad. = 70.23% R-cuad.(ajustado) = 60.31%

Desv.Est. agrupada = 50.12

T N Media Agrupación

3	3	236.00	A
1	3	140.07	A B
2	3	83.73	B

Son significativamente diferentes, entre los valores de histamina tratamientos T1, T2 y T3 a los 55 y 93 días.

ANEXO 4: ENSAYOS DE LABORATORIO DE DIGESTIBILIDAD



**LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



INFORME DE ENSAYOS

N° 000695 - 2016

SOLICITANTE : ARAPA SAN PEDRO Y SAN PABLO S.A.
DIRECCIÓN LEGAL : PLAZA DE ARMAS S/N CERCADO - PUNO
 : RUC: 20322312688 Teléfono: -----
PRODUCTO : ALIMENTO BALANCEADO
NÚMERO DE MUESTRAS : Uno
IDENTIFICACIÓN/OTRA : ERT: 5%
 : ESPECIE: CERDO
 : FASE: ENGORDE
CANTIDAD RECIBIDA : 510,4 g (+ envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
MARCA(S) : S.M.
FORMA DE PRESENTACIÓN : Envasado, la muestra ingresa en bolsa sellada.
SOLICITUD DE SERVICIO : S/S N°EN-000231 -2016
REFERENCIA : PERSONAL
FECHA DE RECEPCIÓN : 18/01/2016
ENSAYOS SOLICITADOS : FÍSICO/QUÍMICO
PERÍODO DE CUSTODIA : 3 Meses, a partir de la fecha de recepción.

RESULTADOS :

ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :

ALCANCE : N.A.

ENSAYO	RESULTADO
1.- Proteína (g / 100 g de muestra original) (Factor: 6,25)	16,7
2.- Digestibilidad de la Proteína in Vitro (g / 100 g de muestra original)	89,2

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

- 1.- AOAC 984.13(A) Ed. 19 Cap. 32 Pág. 14 2012
- 2.- Análisis y Valoración Piensos y Forrajes - Max Becker -1981 AOAC 7.080 1984

FECHA DE EJECUCION DE ENSAYOS: Del 20/01/2016 Al 29/01/2016.

ADVERTENCIA :

- 1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, tratamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.
- 2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.
- 3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.
- 4.- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA

La Molina, 29 de Enero de 2016



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS - UNALM

Alejandrina Sotelo Méndez
 Ing. M. Sc. Alejandrina Sotelo Méndez
 DIRECTORA EJECUTIVA (M)
 CIP. N° 112405



**LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

Instituto de Certificación, Inspección y Ensayos



INFORME DE ENSAYOS

N° 000697 - 2016

SOLICITANTE : ARAPA SAN PEDRO Y SAN PABLO S.A.
DIRECCIÓN LEGAL : PLAZA DE ARMAS S/N CERCADO - PUNO
 : RUC: 20322312688 Teléfono: -----
PRODUCTO : ALIMENTO BALANCEADO
NÚMERO DE MUESTRAS : Uno
IDENTIFICACIÓN/MTRA. : ERT: 10%
 ESPECIE: CERDO
 FASE: Crecimiento
CANTIDAD RECIBIDA : 410,9 g (+ envase) de muestra proporcionada por el solicitante.
MARCA(S) : S.M.
FORMA DE PRESENTACIÓN : Envasado, la muestra ingresa en bolsa sellada.
SOLICITUD DE SERVICIO : S/S N°EN-000231 -2016
REFERENCIA : PERSONAL
FECHA DE RECEPCIÓN : 18/01/2016
ENSAYOS SOLICITADOS : FÍSICO/QUÍMICO
PERÍODO DE CUSTODIA : 3 Meses, a partir de la fecha de recepción.

RESULTADOS :

ENSAYOS FÍSICOS/QUÍMICOS :

ALCANCE : N.A.

ENSAYO	RESULTADO
1.- Proteína (g / 100 g de muestra original) (Factor, 6,25)	15,9
2.- Digestibilidad de la Proteína in Vitro (g / 100 g de muestra original)	89,3

MÉTODOS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO :

- 1.- AOAC 984.13(A) Ed. 19 Cap. 32 Pág. 14 2012
- 2.- Análisis y Valoración Pienso y Forrajes - Max Becker -1961 AOAC 7.080 1984

FECHA DE EJECUCION DE ENSAYOS: Del 20/01/2016 Al 29/01/2016.

ADVERTENCIA :

- 1.- El muestreo, las condiciones de muestreo, empaquetamiento y transporte de la muestra hasta su ingreso a La Molina Calidad Total - Laboratorios son de responsabilidad del Solicitante.
- 2.- Se prohíbe la reproducción parcial o total del presente Informe sin la autorización de La Molina Calidad Total - Laboratorios.
- 3.- Válido sólo para la cantidad recibida. No es un Certificado de Conformidad ni Certificado del Sistema de Calidad de quien lo produce.
- 4.- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL-DA

La Molina, 29 de Enero de 2016



LA MOLINA CALIDAD TOTAL LABORATORIOS - UNALM

Alejandra Sotelo Méndez
 Ing. M. Sc. Alejandra Sotelo Méndez
 DIRECTORA EJECUTIVA (e)
 CIP. N° 117405